

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd



**Sledování vlivu exprese receptorů pro transformující růstový faktor
během aterogeneze u myšího modelu aterosklerózy**

**The study of transforming growth factor receptor during
atherogenesis in mouse model of atherosclerosis**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD

Vypracovala:

Lucie Vybulková

Hradec Králové 2010

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a použila pouze uvedené zdroje a literaturu.“

„Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD za cenné rady a připomínky při vypracování této diplomové práce. Poděkování patří i mé rodině za podporu při studiu a tvorbu potřebného zázemí.“

Abstrakt:

Lucie Vybulková

Sledování vlivu exprese receptorů pro transformující růstový faktor během aterogeneze u myšího modelu aterosklerózy

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Farmacie

Cíl práce:

Cílem práce bylo zavedení metodiky pro detekci TGF- β RI, subtypu ALK-5, a sledování jeho exprese v kořenu aorty u apoE/LDLr-deficientních myší.

Metody:

S využitím samic kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru byla provedena biochemická analýza vzorků krve, histologické barvení olejovou červení k detekci lipidů ve tkáních a imunohistochemická analýza segmentů tkáně pocházejících z aorty a horní poloviny srdce. Pro detekci exprese ALK-5 byla použita metodika EnVision s detekcí pomocí DAB.

Výsledky:

Pomocí biochemické analýzy jsme potvrdili předpokládaný nárůst hladin cholesterolu u myší krmených cholesterolovou dietou ve srovnání se skupinou myší na standardní dietě. Při histologickém barvení olejovou červení jsme detekovali vyšší tvorbu aterosklerotických lézí u myší s cholesterolovou stravou. Imunohistochemickou analýzou exprese ALK-5 jsme prokázali vysokou expresi ALK-5 v tunica media a v aterosklerotických plátech bez výrazného rozdílu u obou skupin myší.

Závěr:

Výsledky ukázaly, že exprese ALK-5 není ovlivněna hladinami cholesterolu ani velikostí aterosklerotických plátů.

Abstract:

Lucie Vybulková

The study of transforming growth factor receptor during atherogenesis in mouse model of atherosclerosis

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Pharmacy

Background:

The aim of this diploma thesis was the establishment of methodology for detection of TGF- β RI, subtype ALK-5, and studying its expression in the aortic root in apoE/LDLr- deficient mice.

Methods:

Using female mice C57BL/6J strain with a double deficit of apolipoprotein E and LDL-receptor was performed biochemical analysis of blood specimens, histologic staining with oil red for detection of lipids in tissues and immunohistochemical analysis of segments of tissue from the aorta and the top half of the heart. To detect expression of ALK-5 was used EnVision method with DAB visualization.

Results:

Using biochemical analysis, we confirmed increased levels of cholesterol in mice fed cholesterol diet as compared with mice on standard diet. At histologic staining with oil red we detected increased formation of atherosclerotic lesions in mice with cholesterol diet. Immunohistochemical analysis of expression of ALK-5 we demonstrated high expression of ALK-5 in the tunica media and in atherosclerotic plaques with no significant difference in the two groups of mice.

Conclusion:

The results showed that expression of ALK-5 is not affected by cholesterol levels or the size of atherosclerotic plaques.

Obsah

1.	Úvod	8
2.	Histologická stavba krevních cév	9
2.1	Artérie	9
2.2	Žíly.....	10
2.3	Kapiláry	11
3.	Ateroskleróza	13
3.1	Lipidy a lipoproteiny	13
3.2	Vznik aterosklerózy	16
3.3	Vývojová stadia aterosklerózy	18
3.4	Typy aterosklerotických plátů.....	20
3.5	Rizikové faktory aterogeneze	21
3.6	Klinická manifestace aterosklerózy	25
4.	TGF-β.....	26
4.1	Syntéza TGF-β	27
4.2	TGF-β v patologii kardiovaskulárních nemocí.....	28
4.3	TGF-β receptory	29
4.4	Smad proteiny	30
5.	Modely aterosklerózy	32
5.1	Myší modely aterosklerózy.....	32
5.1.1	Typy geneticky modifikovaných myších modelů.....	33
6.	Cíl práce.....	35
7.	Experimentální část	36
7.1	Zvířata a předepsaná dieta	36
7.2	Biochemická analýza	36
7.3	Histologické barvení olejovou červení	37
7.4	Imunohistochemie.....	37
7.5	Statistická analýza.....	40
8.	Výsledky.....	41
8.1	Biochemická analýza	41
8.2	Histologické barvení olejovou červení	42
8.3	Imunohistochemická analýza.....	44

9.	Diskuze	47
10.	Závěr	50
11.	Seznam zkratek	51
12.	Použitá literatura	53

1. ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou považována za hlavní příčinu celkové mortality, a to hlavně v průmyslově vyspělých zemích. Za nejčastější příčinu kardiovaskulární mortality je považována ischemická choroba srdeční, která bývá v mnoha případech způsobena koronární aterosklerózou (1).

Ateroskleróza je onemocnění tepen, kdy se v jejich stěnách ukládají krevní lipidy, což vyvolává zánětlivou reakci s účastí řady zánětlivých buněk (1). Ukládáním tukových látek se vytvářejí aterosklerotické pláty, to vede ke zužování lumen cév, jehož důsledkem je snížení průtoku krve postiženou cévou. Často jsou aterosklerotické změny patrné na cévách již v raném dětství, ale ke klinickým projevům zpravidla dochází až mnohem později (2). Mezi tyto projevy patří např. ischemická choroba srdeční, ischemická choroba dolních končetin, cévní mozková příhoda (1).

Přesná příčina onemocnění není známa, proto ani nelze aterosklerózu vyléčit. Farmakologicky ovlivnit lze pouze následky aterosklerózy a rizikové faktory, které se podílejí na jejím vzniku.

Rizikové faktory lze rozdělit na ovlivnitelné (hlavně hypercholesterolémie, kouření, arteriální hypertenze, nedostatečná fyzická aktivita, obezita centrálního typu, diabetes mellitus, porušená glukózová tolerance) a neovlivnitelné (věk, pohlaví, rodinná anamnéza) (1).

K hodnocení rizik rozvoje KVO bylo vypracováno mnoho modelů, přičemž se doporučuje používat nedávno vypracovaný model a tabulky rizika SCORE, které poukazují na 10-leté riziko fatálního kardiovaskulárního onemocnění v ČR podle pohlaví, věku, systolického krevního tlaku, celkového cholesterolu a kuřáckých návyků.

Problematika prevence a léčby aterosklerotických projevů je velmi aktuální vzhledem k vysokému podílu tohoto onemocnění na mortalitě a morbiditě. Stále se vyvíjející technické možnosti umožňují dokonalejší zkoumání mechanismů onemocnění, a proto lze v budoucnu očekávat zlepšení léčby a prognózy nemocných.

2. HISTOLOGICKÁ STAVBA KREVNÍCH CÉV

Stavba stěny všech krevních cév je v podstatě obdobná a skládá se ze 3 vrstev (3):

1) Tunica intima: Nachází se zcela uvnitř a je v bezprostředním kontaktu s krví. Skládá se z jedné vrstvy endoteliálních buněk, pod níž leží subendoteliální vazivová tkáň. Ploché endotelové buňky ležící na bazální membráně jsou spolu spojeny pomocí zonulae occludentes. Buňky endotelu jsou vysoce metabolicky aktivní a podílejí se na transportu látek skrz cévní stěnu, mají také dobrou regenerační schopnost. Syntetizují množství látek, mezi nimi i vasoaktivní látky jako je endothelin nebo oxid dusnatý, prostacykliny, cytokiny, růstové faktory, adhezní molekuly a další. Od tunica media je intima oddělena prostřednictvím membrana elastica interna (3).

2) Tunica media: Je to střední vrstva ležící vně od intimy. Skládá se z hladkých svalových buněk, kolagenních a elastických vláken. Hladkosvalová vlákna jsou spirálovitě uspořádána. Buňky hladkých svalů medie nemají jen kontraktilní vlastnosti, nýbrž také metabolické a fagocytární (3). Mezi medií a adventicií lze ve velkých artériích pozorovat vrstvu membrana elastica externa (3, 4).

3) Tunica adventitia: Je to vnější vrstva nazývaná také tunica externa. Je tvořena hlavně kolagenními vlákny a jen málo hladkosvalovými vlákny. Uvnitř procházejí vasa vasorum a nervová vlákna. Prostřednictvím adventicie jsou cévy spojeny s okolní tkání (3). Ve vénách je to nejsilnější vrstva (4).

Výživa tunica intima a vnitřní části tunica media cév s průměrem nad 1 mm je zajištěna difúzí živin z krve. Vnější vrstvy jsou pak zásobovány vlastními cévami – vasa vasorum. V cévní stěně se také nachází komplexní systém vegetativních a senzitivních vláken. Nervové plexy leží většinou mezi vrstvami cévní stěny a podílejí se na regulaci cévního tonu (3).

Krevní cévy se dělí podle typu a velikosti na artérie, žíly a kapiláry.

2.1 Artérie

Artérie jsou cévy vysokotlakého řečiště, které musí klást odpor vysokému krevnímu tlaku. Rozlišují se dva základní typy: artérie elastického typu a artérie svalového typu.

a) Artérie elastického typu jsou charakterizovány množstvím elastických vláken v tunica media. Typickým příkladem je aorta a její větve. Aorta má vzhledem k vysokému mechanickému zatížení silnou intimu a vyvinutou subendoteliální vrstvu, obsahuje kolagenní a elastická vlákna a hladké svalové buňky. Media je velmi široká a je tvořena navzájem propojenými elastickými blankami. Elastické vrstvy jsou spojeny s hladkými svalovými buňkami. Elastické vlastnosti medie vedou ke vzniku odporu proti roztažení cévy a k hromadění energie v cévní stěně. Tato energie je dále využita k udržení kontinuálního toku krve. Tunica adventitia je tenká a obsahuje vlákna kolagenní i elastická (3).

b) Artérie svalového typu obsahují mnohem více hladkosvalových buněk. K tomuto typu patří střední a malé artérie, přičemž malé artérie přecházejí do arteriol (3, 5). Odlišuje se od artérie elastického typu menším zastoupením elastických vláken v medii, kde dominují hlavně hladké svalové buňky. Tunica adventitia odpovídá stavbou elastickým artériím (5).

Nejmenší artérie se nazývají arterioly a skládají se z endotelu často bez subendoteliální vazivové tkáně. Media je tenká, tvořená hladkosvalovými buňkami. Tenká adventicie obsahuje kolagenní vlákna (4).

2.2 Žíly

Žíly jsou kapacitní cévy, hodnoty tlaku jsou zde nízké. Jejich stěny jsou zpravidla tenčí než stěny odpovídajících artérií. Tunica intima má v podstatě podobnou stavbu jako artérie. Media vykazuje většinou regionální rozdíly ve stavbě. Může být tenká a chudá na hladkosvalové buňky (např. žíly v oblasti břicha a krku), naopak žíly rukou a nohou jsou silnější. V medii je obsaženo mnoho kolagenních vláken. Tunica adventitia může být tvořena longitudinální hladkou svalovinou. To platí hlavně pro žíly oblasti břicha (vena cava inferior, vena portae), u kterých je tunica adventitia nejsilnější vrstvou (6).

Ve středně velkých a velkých žilách jsou vytvořeny žilní chlopně, což jsou výběžky intimy do lumina. Jejich funkcí je usměrňování toku krve směrem k srdci (3).

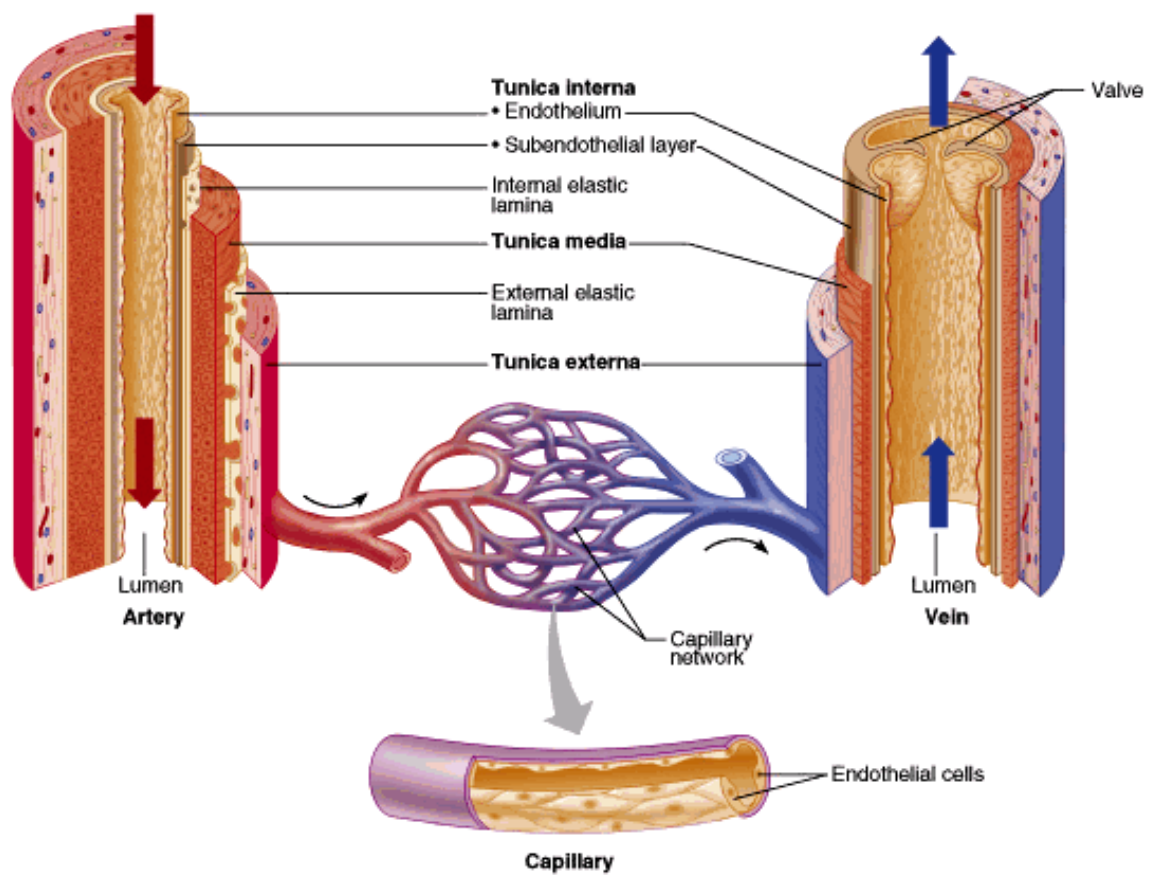
Jako venuly jsou označovány žíly s malým průměrem pod 0,5 mm a jsou pokračováním kapilár. Žilní chlopně u nich nejsou vyvinuty.

2.3 Kapiláry

Kapiláry (vlásečnice) jsou nejtenčí cévy o průměru 4-15 μ m. Mají specifickou úlohu, která je zprostředkována cévním endotelem. V závislosti na typu jsou rozdílně propustné pro jednotlivé součásti krve. Tímto způsobem může být výměna látek a plynů optimálně přizpůsobena potřebám tkáně (3). Rozlišuje se kontinuální endotel a diskontinuální, fenestrováný endotel (6).

Kapiláry jsou tvořeny výhradně z endotelu a pod ním ležící bazální membrány, která odděluje cévy od okolní tkáně. Endotelové buňky jsou spojeny těsnými spoji a vykazují vysokou metabolickou aktivitu (3). Tak například inaktivují biologicky účinné látky (bradykinin, serotonin, prostaglandiny), odbourávají lipoproteiny, produkují prostacyklin a účastní se kapilárního transportu (4). Tunica media a adventitia u kapilár chybí. Na místě medie se vyskytuje nesouvislá vrstva pericytů, které mají s endoteliálními buňkami společnou bazální membránu. Pericyty jsou mezenchymatického původu a fungují jako pluripotentní buňky, které se mohou diferencovat např. na hladké svalové buňky nebo tukové buňky (3).

Obrázek 1: Stavba krevních cév.



<http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/notes5%20circulatory%20anatomy.htm>

(25.4.2010)

3. ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je hlavní příčinou onemocnění srdce a cévní mozkové příhody a způsobuje 50% všech úmrtí v průmyslově vyspělých zemích (7). Je to proces, kdy dochází k přestavbě arteriální stěny a to především v důsledku kumulace tukových látek a tvorby aterosklerotického plátu. To vede ke zužování lumen cév a tím snížení průtoku krve (2).

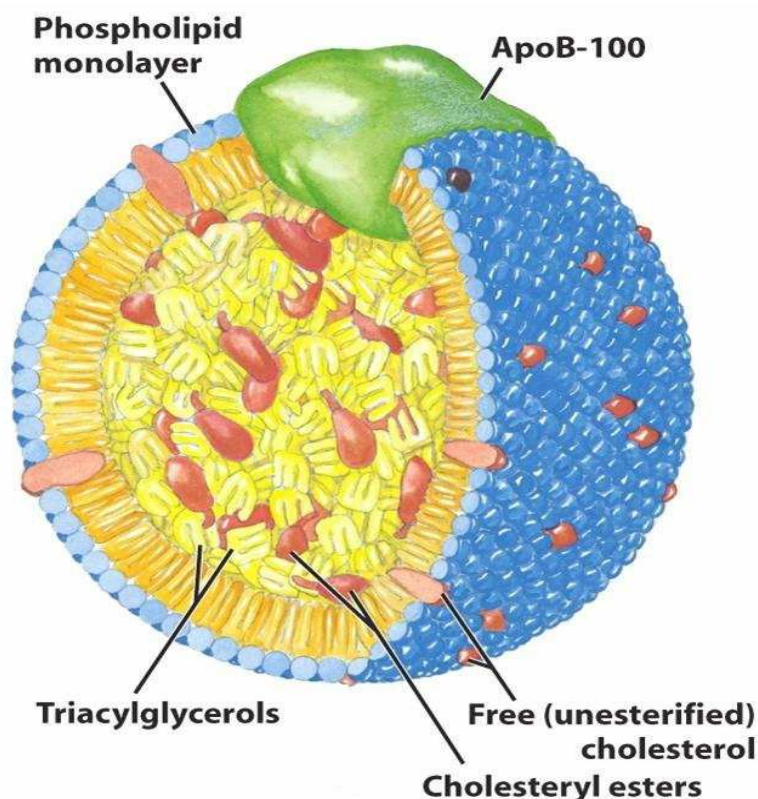
Dlouhou dobu panovala představa, že aterosklerotické pláty jsou způsobeny pouze pasivním ukládáním lipidů do stěny artérií (2). Novější výzkumy přinesly závěry, že jde spíše o aktivní děj, na němž se podílí řada faktorů a zánětlivých buněk. Toto chronické zánětlivé onemocnění pak může vyvolávat rupturu aterosklerotických plátů a akutní kardiovaskulární onemocnění (infarkt myokardu a cévní mozkové příhody) (7). Zánětlivý charakter onemocnění potvrzuje účast zánětlivých buněk – především monocytů, ze kterých vznikají makrofágy, dále lymfocytů, aktivovaných endotelií a buněk hladkého svalstva, které vytvářejí zánětlivé mediátory (1).

3.1 Lipidy a lipoproteiny

Mezi lipidy nacházející se v krevní plazmě řadíme cholesterol, triacylglyceroly (TAG), fosfolipidy a volné mastné kyseliny. Jelikož jsou všechny lipidy nerozpustné ve vodě, musí být transportovány krví ve formě lipoproteinů. Lipoproteiny jsou částice tvořené lipidy a apolipoproteiny. Apolipoproteiny (apoproteiny, Apo) jsou speciální proteiny sloužící jako ligandy buněčných receptorů či jako aktivátory nebo inhibitory enzymů v metabolismu lipoproteinů (1, 8).

Lipoproteinová částice je složena z jádra a obalu. Jádro obsahuje lipofilní složky – triacylglyceroly a esterifikovaný cholesterol. Obal je tvořen volným cholesterolem a fosfolipidy, které svou amfifilní strukturou zajišťují rozpustnost částice ve vodném prostředí. Dále obsahuje i již zmiňované apolipoproteiny, jejichž typy záleží na druhu lipoproteinové částice. Tak např. u typu VLDL a LDL nacházíme nejčastěji apoB-100, u HDL zase apoA-1. Jednotlivé lipoproteiny mají odlišné složení lipidové i bílkovinné složky, odlišnou velikost a funkci (1).

Obrázek 2: Struktura lipoproteinové částice.



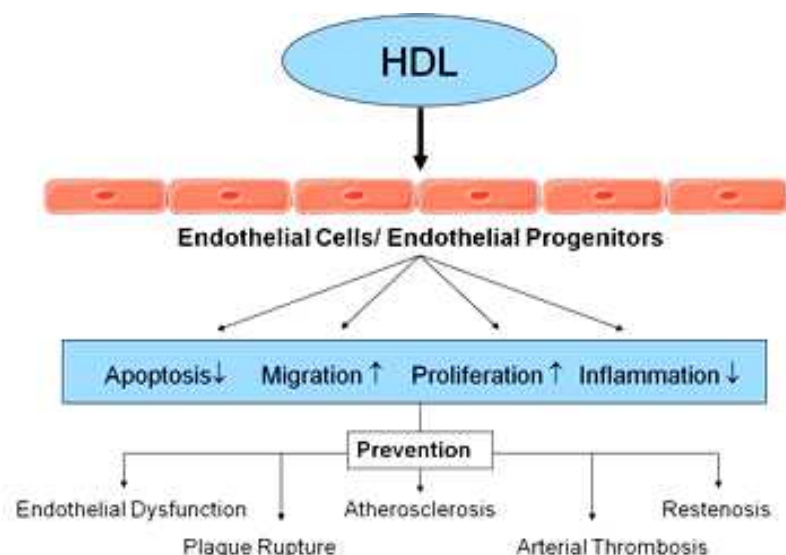
http://dolly.biochem.arizona.edu/Bioc462b_Honors_Spring_2009/jlarsen/Insulin%20Resistance.html (19.4.2010)

Chylomikrony a VLDL (very low density lipoproteins): Transport lipidů začíná ve střevě a v játrech. Ve střevě se TAG akumulují v enterocytech a pocházejí z přijímané stravy. V játrech pocházejí TAG z endogenní syntézy, která vychází ze sacharidů a volných mastných kyselin. TAG ze střeva jsou inkorporovány do chylomikronů, TAG z jater do VLDL. Obojí se dostávají do periferní cirkulace a v tukové a svalové tkáni jsou odbourávány lipoproteinovou lipázou. Tím se snižuje jejich velikost a zvyšuje relativní obsah cholesterolu. Tyto částice se nazývají zbytky (remnants) (8). Zbytky VLDL jsou rozpoznávány LDL-receptory na rozdíl od zbytků chylomikronů, protože obsahují jiný typ apoB.

HDL (high density lipoproteins) částice: Tyto částice jsou tvořeny především v játrech a obsahují 3 druhy apolipoproteinů apoA-1, apoA-2 a apoE. Jejich funkcí je zpětný transport cholesterolu z periferních tkání do jater, a proto se někdy nazývají jako anti-aterogenní lipoproteiny (1, 9). Díky své antioxidační schopnosti brání oxidaci LDL na aterogenní formu oxLDL (2). HDL také zvyšuje proliferaci a migraci endotelových

buněk a endotelových progenitorových buněk a tím podporuje obnovu integrity endotelu. Z jeho účinků jsou významné též protizánětlivé vlastnosti a inhibice apoptózy endotelových buněk (10).

Obrázek 3: Účinek HDL na endotelové buňky (10).



Je proto snaha hladiny HDL zvyšovat. Některé způsoby zvýšení HDL jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 1: Možnosti zvyšování HDL.

Doporučení ke zvýšení HDL cholesterolu*	HDL cholesterol snižuje
Nekuřáctví	Kuřáctví
Pravidelná fyzická aktivita	Fyzická inaktivita
Nenasycené mastné kyseliny	Saturované tuky
U žen v menopauze: estrogeny	Androgeny
U obezity redukce hmotnosti	Obezita

* HDL cholesterol zvyšuje i umírněná konzumace alkoholu, toto doporučení však musí být individuálně velmi pečlivě zvažováno vzhledem k dalším potenciálním rizikům konzumace alkoholu

https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_7005.html (27.4.2010)

LDL (low density lipoproteins): Jsou to lipoproteiny vznikající degradací VLDL odštěpením většiny triacylglycerolů lipoproteinovou lipázou. Tím se zvyšuje jejich relativní obsah esterifikovaného cholesterolu. Jejich dominantním apolipoproteinem je apoB-100 (1). Částice LDL jsou nejdůležitější transportní formou esterů cholesterolu a zajišťují jeho přísun extrahepatálním tkáním.

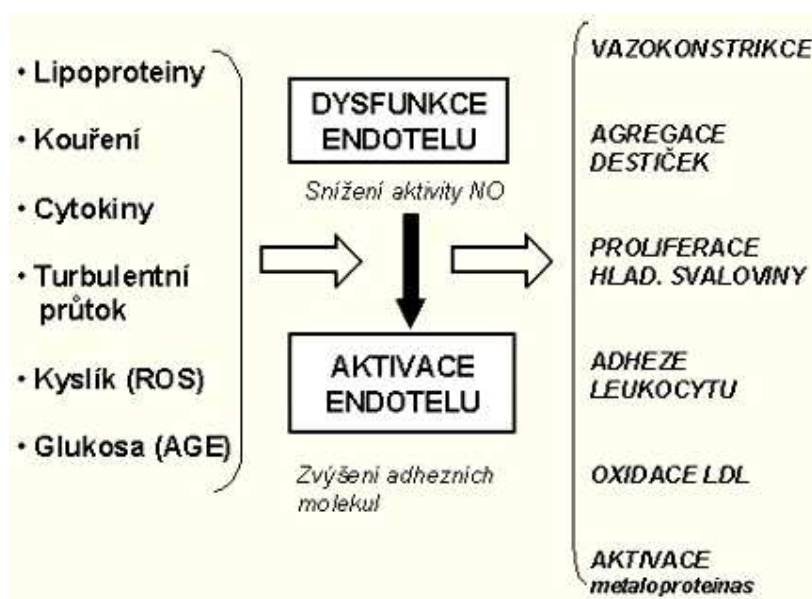
V aterosklerotických lézích jsou nejčastěji nalézány 3 typy lipoproteinů. Jsou to především malé denzní LDL, zbytky lipoproteinů nazývané β -VLDL a lipoprotein (a) označovaný jako Lp(a). Tyto aterogenní částice jsou vychytávány v intimě a podléhají chemické modifikaci, především oxidaci. Oxidované LDL jsou nejvíce aterogenní lipoproteiny a jsou vždy spojovány se vznikem pěnových buněk, zatímco Lp(a) jsou ukládány hlavně v extracelulární matrix a mohou působit prozánětlivě (9).

3.2 Vznik aterosklerózy

Podkladem pro vznik aterosklerózy je dysfunkce cévního endotelu. Endoteliální dysfunkce je definována jako funkční poškození endotelu, charakterizované především zvýšenou propustností cévní stěny, nerovnováhou mezi vazoaktivními, hemokoagulačními a proliferaci inhibujícími, resp. stimulujícími působky (11, 12).

Mezi hlavní příčiny dysfunkce endotelu patří hyperlipoproteinémie (především zvýšená hladina LDL a to zejména oxidované či glykované LDL), hyperglykémie, hyperinzulinémie, hypoxie, hyperhomocysteinémie, kouření, ionizující záření, cytostatika, stárnutí, imunokomplexy a různé infekce (13, 14, 15).

Obrázek 4: Faktory vedoucí k dysfunkci a aktivaci endotelu.



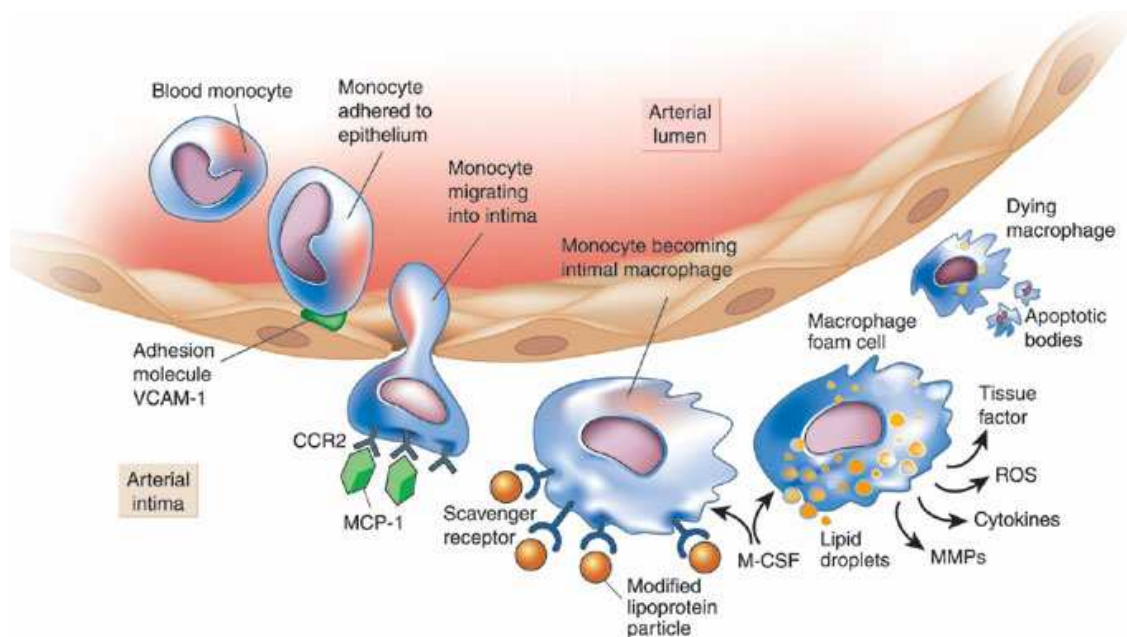
<http://www.zdravcentra.sk/index.php?act=k-10&did=407> (19.4.2010)

Endotelová dysfunkce je základní podmínkou pro vznik aterosklerózy (16). Reakcí na endoteliální poruchu je mimo jiné i zvýšený průnik LDL částic do cévní stěny a jejich oxidace (17). Po aktivaci mohou endotelové buňky patologicky exprimovat cytoadhezivní molekuly především VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), selektiny E a P, které umožňují navázání monocytů a dalších imunitně aktivních buněk, které způsobí rozvoj zánětu. Endotelové buňky dále produkují některé působky jako PDGF, BFGF a TGF- β , které mají mitogenní účinek a indukují proliferaci vazivové tkáně (2, 17). Další produkty endotelu IL-1, TNF- α a MCP-1 vedou k zesílení zánětu a působí jako chemoatraktanty monocytů. Při endotelové dysfunkci dochází i k deregulaci koagulačních a fibrinolytických aktivit snížením produkce aktivátoru plazminogenu a převahou produkce inhibitoru aktivátoru plazminogenu, čímž dochází k převaze prokoagulačních faktorů (2).

Zvýšená exprese adhezivních molekul způsobí kumulaci monocytů v cévní stěně a jejich přeměnu na makrofágy. Makrofág exprimuje na svém povrchu jednak specifické LDL-receptory, jejichž exprese je regulována intracelulární koncentrací cholesterolu, a jednak tzv. scavengerové receptory. Počet těchto receptorů nezávisí na hladině cholesterolu jako je tomu u specifických LDL-receptorů, a proto při nadbytku LDL se zvyšuje i pohlcování těchto částic makrofágem, přičemž dochází ke kumulaci hlavně oxidovaných forem LDL. Takto vznikají tzv. pěnové buňky, které

tvoří základ aterosklerotického plátu (2, 18). Nahromaděním pěnových buněk se tvoří tukové proužky, které lze pozorovat v cévách lidí už kolem 20. roku věku. Pěnové buňky jsou aktivní buňky produkující řadu růstových faktorů, zánětlivých mediátorů a enzymů. Také se mohou rozpadat a vytvářet hlavní extracelulární masu ateromu (2).

Obrázek 5: Přeměna monocyту na makrofág a pěnovou buňku.



<http://www.nature.com/nature/journal/v420/n6917/images/nature01323-f1.2.jpg> (25. 4. 2010)

V dalších fázích aterogeneze se vytvářejí fibrózní pláty, které obsahují velké množství extracelulárních lipidů, zejména pak cholesterolu a jeho esterů, a buňky hladkého svalstva cévní stěny, které produkují extracelulární matrix. Migrace buněk hladkého svalstva je zajištěna cytokiny a růstovými faktory produkovanými makrofágy (17).

3.3 Vývojová stadia aterosklerózy (19)

Z morfologického hlediska se rozlišuje 6 stupňů rozvoje aterosklerotické léze:

Stupeň 1: Jedná se o izolované pěnové buňky, které v intimě cév nalézáme již v dětském věku a pouhým okem nejsou viditelné. V prvních 8 měsících života lze pozorovat pěnové buňky v koronárních cévách až u 45 % dětí (19).

Stupeň 2: Dalším vývojem vznikají tukové proužky, a to nakupením pěnových buněk. Lipidy jsou přítomny i v intimálních hladkých svalových buňkách. Existují dva

typy tukových proužků, progredující a neprogredující, přičemž u progredujících je pozorováno více hladkých svalových buněk, extracelulární matrix, makrofágů a pěnových buněk. V ascendentní aortě lze pozorovat tukové proužky již u malých dětí, v abdominální aortě jich přibývá po 30. roce věku. Důležité je, že u těchto lézí se nalézají většina lipidů intracelulárně.

Stupeň 3: Dochází ke zvyšování množství lipidů i extracelulárně pod proužky makrofágů a pěnových buněk. Stejně jako u typu 2 mohou být lipidy přítomny i v hladkých svalových buňkách. Extracelulárně obsažené lipidy mohou narušovat soudržnost vrstvy hladkých svalových buněk. Od typu 2 se liší vyšším obsahem volného cholesterolu, mastných kyselin, sfingomyelinu a triglyceridů (19).

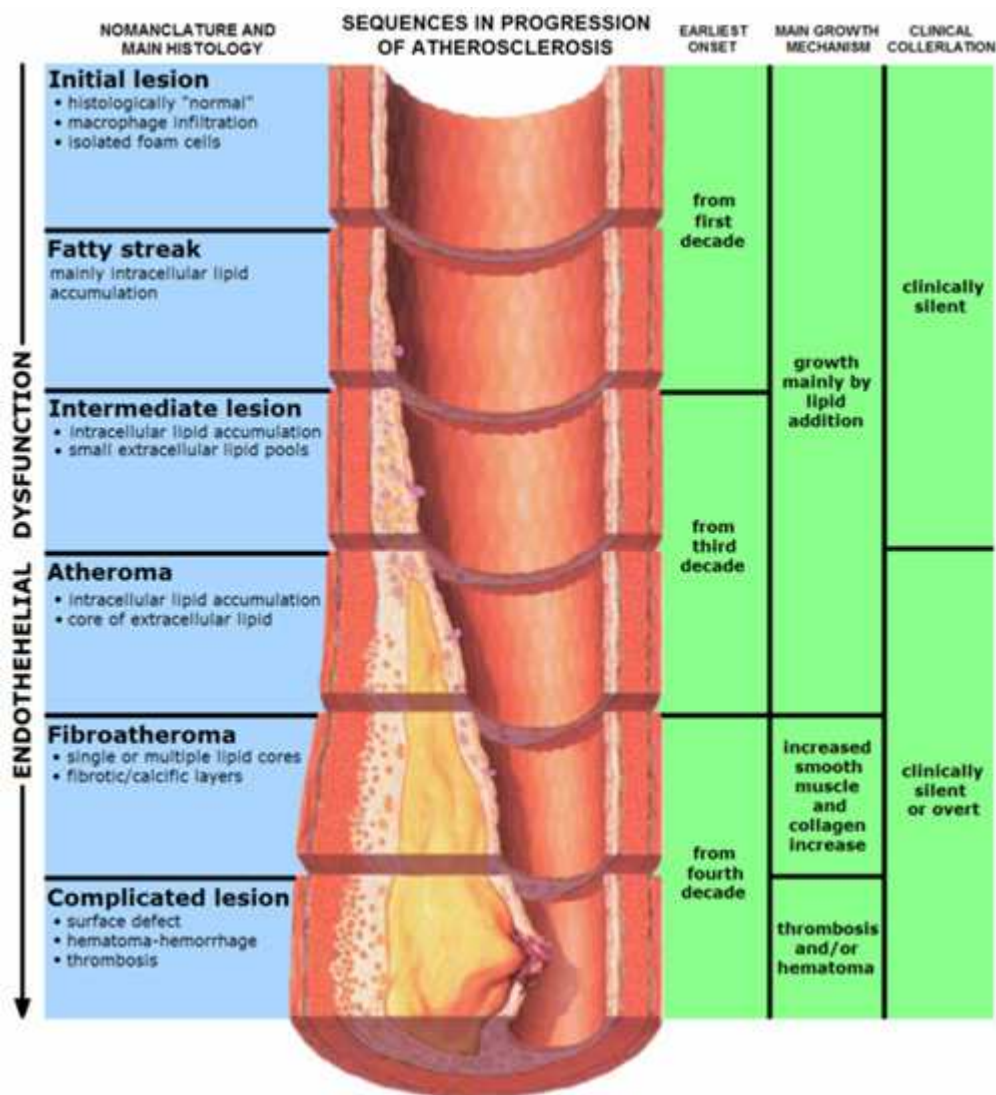
Stupeň 4: Aterom - nahromaděním extracelulárních lipidů vzniká lipidové jádro, dochází k rozpadu pěnových buněk a depozici vápníku. Není zde typický nadměrný růst fibrózní tkáně, a proto nedochází ještě k významnému omezení průtoku krve středně velkými artériemi. Aterom se řadí již k pokročilým lézím a to z důvodu dezorganizace intimy lipidovým jádrem. Klinický význam tohoto stadia může být velký i přes to, že tento typ léze nezpůsobuje zpravidla velké zúžení lumen cév. Jelikož oblast mezi lipidovým jádrem a povrchem léze obsahuje proteoglykany, pěnové buňky a jen málo hladkých svalových buněk a kolagenu, mohou se zde tvořit trhliny. V tomto případě se pak už jedná o lézi typu 6 (20).

Stupeň 5: Léze obsahují vystupující fibrózní tkáň se zvýšeným obsahem kolagenu a hladkých svalových buněk. Rozlišuje se více typů této léze. Pokud je obsaženo lipidové jádro, jedná se o fibroaterom. Lipidové jádro může být i značně kalcifikováno, případně může i úplně chybět. Lumen cév je mnohem více zúženo než u typu 4 a opět zde mohou vznikat praskliny, hematomy či tromby.

Stupeň 6: Jedná se o komplikovanou lézi s rupturami na povrchu, hematodem, hemoragií či trombózou, která může vést k okluzi cévy a tím manifestaci akutního koronárního syndromu (akutní infarkt myokardu, nestabilní angina pectoris, náhlá srdeční smrt). Ruptura povrchu může být způsobena přítomností zánětlivých buněk v lézi, uvolněním proteolytických enzymů makrofágy, koronárním spasmem či tlakovou zátěží (20).

Aterosklerotické aneurysma: jedná se o vývojové stadium léze typu 6 s erozí intimy a alterací extracelulární matrix a medie (20).

Obrázek 6: Vývoj aterosklerózy.



www.healthyfellow.com/144/vitamin-c-deficiency/ (22. 4. 2010)

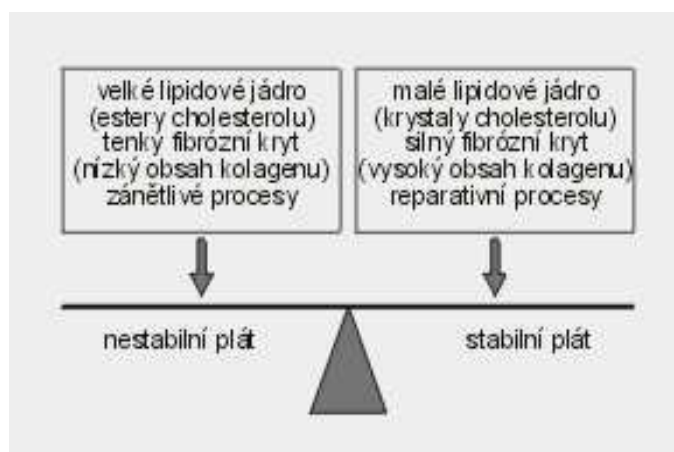
3.4 Typy aterosklerotických plátů

Rozlišujeme pláty stabilní a nestabilní (1). Typický aterosklerotický plát obsahuje lipidové nebo nekrotické jádro překryté fibrózní čepičkou složenou ze směsi hladkých svalových buněk a extracelulární matrix. Základ léze je často tvořen množstvím pěnových buněk a T-lymfocytů. Tyto komponenty určují stabilitu plátu. Stabilní plát bývá tvořen malým lipidovým jádrem a překrytý tlustou fibromuskulární čepičkou s mnoha hladkosvalovými buňkami a extracelulární matrix (9). Stabilní plát

má kryt zpevněn kolagenem, elastinem a proteoglykany (2). Naopak nestabilní pláty často obsahují velké lipidové jádro a tenkou čepičku s množstvím zánětlivých buněk.

Hlavním problémem u stabilních plátů je riziko stenózy a uzávěru cévy postupným zužováním jejího průsvitu. Naproti tomu u nestabilních plátů hrozí jejich ruptura a vznik akutního koronárního syndromu (9).

Obrázek 7: Základní charakteristika aterosklerotického plátu.



https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_6764.html (20.4.2010)

Ruptura ateromu je vysvětlována produkcí matrixových metaloproteinás (MMPs) makrofágy, které mohou narušovat tenkou čepičku. Sekreci metaloproteinás mohou zvyšovat některé cytokiny např. TNF- α , IL-1 či MG-CSF (21). Činnost matrix-degradujících MMPs je nezbytná pro mnoho procesů při tvorbě aterosklerotického plátu, včetně infiltrace zánětlivých buněk, migrace hladkých svalových buněk a proliferace, stejně jako pro angiogenezi. Asi nejzávažnější důsledky činnosti MMPs jsou nepříznivé účinky na stabilitu plátu a odolnost vůči roztržení, což může vést k nestabilní angině pectoris, infarktu myokardu či cévní mozkové příhodě (22).

3.5 Rizikové faktory aterogeneze

Rizikové faktory můžeme rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mechanismus působení těchto faktorů je mnohočetný, ale výsledkem je vždy endotelová dysfunkce, která přispívá k rozvoji aterosklerózy.

Důležitá je u KVO primární a sekundární prevence. Primární prevencí KVO se rozumí péče o pacienty s nakupením rizikových faktorů a vysokým celkovým rizikem KVO a komplexní ovlivnění těchto faktorů tak, aby se zabránilo vzniku aterosklerózy a jejím klinickým manifestacím. Riziko fatálního KVO v následujících 10 letech se odhaduje na základě tabulek SCORE, které berou v úvahu pohlaví, věk, systolický TK, kouření a hladinu cholesterolu. Za vysoce rizikové jsou považováni pacienti s rizikem $\geq 5\%$. Sekundární prevence se uplatňuje u osob s již klinicky manifestovaným KVO (ICHs, ICHDK, CMP) s cílem zabránit progresi nemoci (1). Na úroveň sekundární prevence se staví i diabetici.

Neovlivnitelné faktory:

Věk: muži > 45 let, ženy > 55 let

Pohlaví: U žen před menopauzou se projevuje protektivní vliv estrogenů a gestagenů.

Rodinná zátěž: Za genetickou predispozici se považuje přítomnost předčasné klinické manifestace aterosklerózy u příbuzných prvního stupně u mužů < 55let a u žen < 65 let (1)

Ovlivnitelné faktory:

Hyperlipoproteinémie: Především chemicky modifikované LDL částice jsou hlavní příčinou narušení endotelu a indukují expresi prozánětlivých molekul v endoteliálních buňkách (23). LDL částice pronikají do subendoteliálního prostoru v určité míře i při fyziologických hladinách lipoproteinů. Za těchto podmínek nejsou ale výrazně oxidovány a jsou opět účinně odstraňovány z intimy. Pokud nejsou přítomny další faktory poškozující endotel, dochází k nadměrné produkci oxLDL pouze při výraznější hyperlipidémii. Při poškození endotelu dalšími faktory, např. diabetem, stoupá propustnost endotelu a oxLDL se budou kumulovat i při nižších hladinách lipidů v krvi (24).

Diabetes mellitus: Nejdůležitějším faktorem je pravděpodobně tvorba produktů pozdní glykace (AGE - advanced glycation end-product), které se váží na specifický receptor (RAGE). Tento receptor navozuje aktivaci NF- κ B a intracelulární oxidační stres (25). V důsledku zvýšeného oxidačního stresu endotelové buňky zvyšují expresi adhezních molekul jako je E-selektin, VCAM-1 a ICAM-1. Diabetici mají také sníženou endotel-dependentní vazodilataci, hyperkoagulabilitu, zvýšenou hladinu PAI-1

v cévní stěně s poruchou fibrinolýzy, sníženou NO-syntázu a zvýšenou hladinu endotelinu-1 (26).

Hypertenze: U pacientů s hypertenzí jsou často zvýšené koncentrace angiotensinu II (AII), hlavního produktu angiotensin-konvertujícího systému. AII je silný vazokonstriktor a může přispět k aterogenezi stimulací růstu buněk hladké svaloviny. AII se váže na specifické receptory hladké svaloviny, což vede k aktivaci fosfolipázy C a to může vést ke zvýšení intracelulární koncentrace vápníku a kontrakci hladké svaloviny, zvyšuje syntézu proteinů a hypertrofii hladkých svalových buněk (27). Také zvyšuje činnost hladkosvalové lipoxxygenázy, což může zesílit zánět a oxidaci LDL. Při hypertenzi je též zvýšena tvorba volných radikálů, které snižují syntézu oxidu dusnatého v endotelu a zvyšují adhezi leukocytů (28).

Obezita: Je obecně známo, že obezita zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění. Je to způsobeno zvýšenou hladinou CRP u těchto osob, která odráží vyšší množství cytokinů (29, 30). Tyto prozánětlivé cytokiny jsou secernovány zmnoženou tukovou tkání. Snížením hmotnosti můžeme pozorovat i snížení hladin CRP, což znamená, že kontrolou hmotnosti lze snížit prozánětlivý stav (23). Obezita se hodnotí na základě body-mass indexu (BMI), což je podíl hmotnosti v kg a druhé mocniny výšky v metrech. Obezitě odpovídají hodnoty $BMI \geq 30,0$.

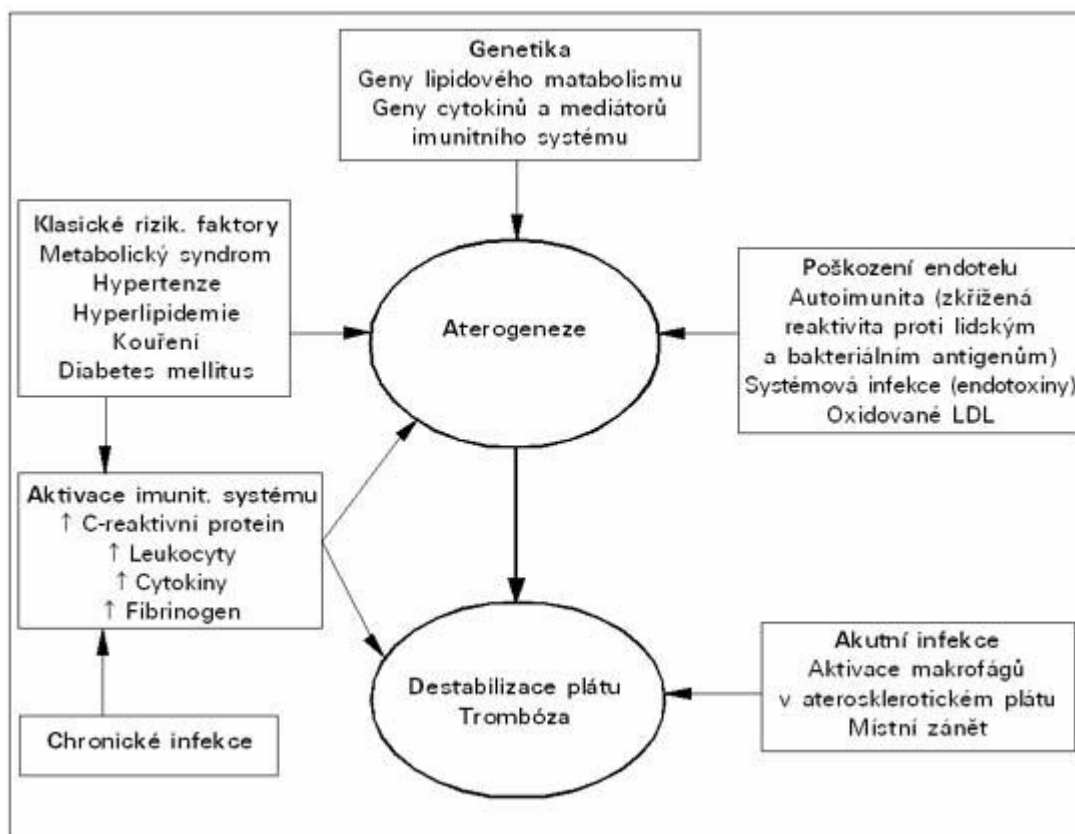
Homocystein: Homocystein je esenciální aminokyselina obsahující síru, která vystupuje v metabolismu methioninu (31). Hyperhomocysteinémie je pozorována přibližně u 5% z celkové populace, a je spojována se zvýšeným rizikem vzniku některých poruch, např. cévní a neurodegenerativní onemocnění, autoimunitní onemocnění, vrozené vady, diabetes, onemocnění ledvin, osteoporóza, neuropsychiatrické poruchy a rakovina (32, 31). Zvýšená hladina homocysteinu v lidské plazmě může být buď vrozená či získaná. Získaná hyperhomocysteinémie může být důsledkem chronického onemocnění, dlouhodobé medikamentózní léčby nebo abnormální stravy (33). Vrozená hyperhomocysteinémie je výsledkem enzymatických defektů na různých místech metabolismu homocysteinu, především jde o defekt 5,10-methyltetrahydrofolát-reduktázy (34). Mechanismus, kterým působí homocystein jako rizikový faktor pro cévní onemocnění dosud nebyl plně objasněn, ale předpokládá se zapojení endoteliální dysfunkce a lipoperoxidace. Léčba hyperhomocysteinémie spočívá v podávání kyseliny listové a vitamínů B6 a B12 (35).

Fyzická inaktivita: Je známo, že pravidelná fyzická aktivita má pozitivní účinky na zdraví a prevenci KVO. Volba typu fyzické aktivity musí odpovídat zdravotnímu stavu a tělesné hmotnosti. Ideální je cvičení 30-45 minut 3-4x týdně.

Kouření: Kouření cigaret je hlavním rizikovým faktorem pro rozvoj aterosklerózy. Jeho negativní vliv spočívá v poruše endotel-dependentní vazodilatace, případně v navození oxidačního stresu a následně endotelové dysfunkce (36).

Infekce: Nový výzkum se zaměřuje na zkoumání vztahů mezi aterosklerózou a určitými chronickými bakteriálními a virovými infekcemi (22). Nejvíce jsou diskutovány infekce patogeny *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* a cytomegalovirus (37). Přesto na jednoznačné závěry studií na toto téma se stále čeká.

Obrázek 8: Vliv rizikových faktorů na rozvoj aterosklerózy.



<http://www.tigis.cz/alergie/al104/09.htm> (28.4.2010)

3.6 Klinická manifestace aterosklerózy

Chronický proces aterosklerózy, který se vyvíjí několik desetiletí se v konečném důsledku může projevit různými způsoby (38). V souladu s tímto se některé klinické důsledky odvozují od postupného uzavěru postižené cévy, což vede k chronické ischemii. Naproti tomu i přes dlouhou dobu vývoje aterosklerózy se mohou vyskytnout závažné až fatální komplikace během minut. Tyto komplikace zahrnují akutní koronární syndromy a tromboembolie.

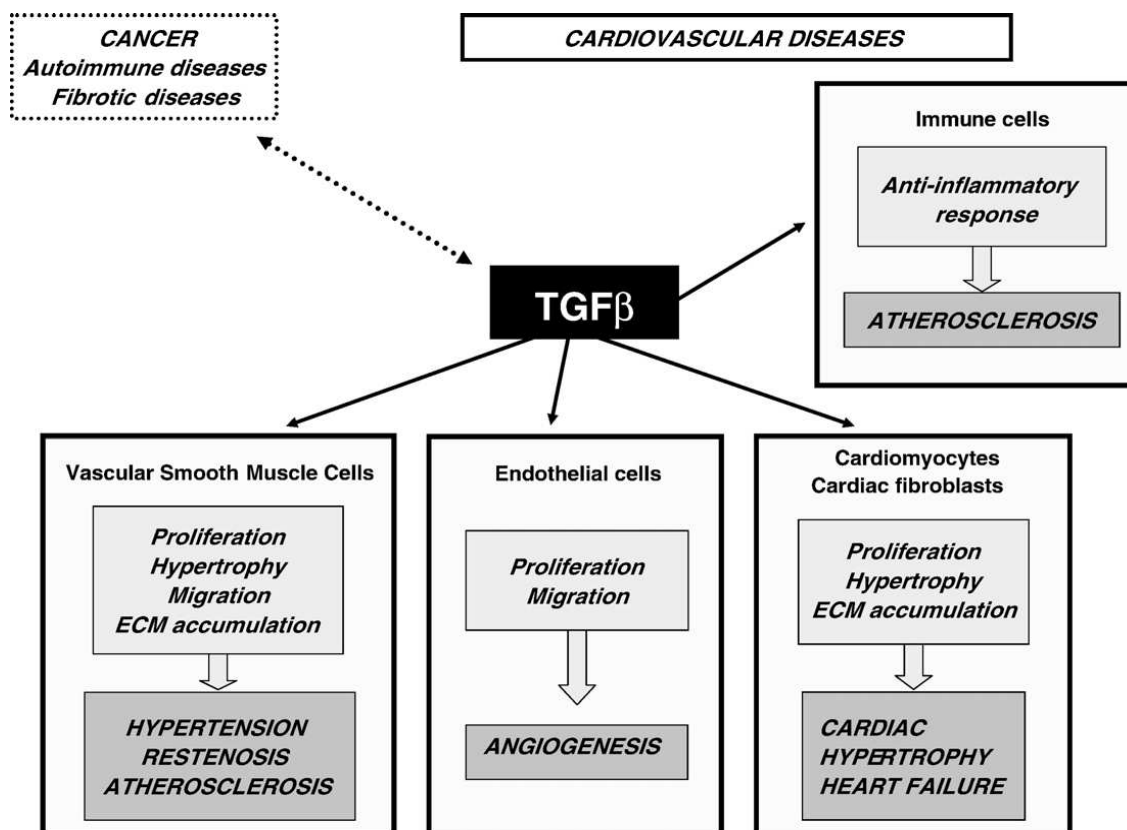
Narůstání aterosklerotického plátu vede ke zužování lumen cévy a omezení průtoku krve. Projevy chronické ischemie se odvíjejí od místa lokalizace stenózy: angina pectoris je výsledkem stenózy v koronárním řečišti, klaudikace v ileo-femorálním řečišti a přechodné mozkové ischemie v cévním řečišti zásobujícím mozek.

Akutní syndromy nevznikají přímým omezováním průtoku krve artérií, nýbrž rupturou nestabilního aterosklerotického plátu. Tím dochází k expozici kolagenu, lipidů a hladkých svalových buněk, což vede k aktivaci koagulační kaskády a v postiženém místě se vytváří trombus, který způsobuje nestabilní anginu pectoris případně akutní infarkt myokardu, pokud uzavírá celou cévu. Toto riziko ruptury plátu závisí spíše na morfologii plátu než na jeho velikosti či závažnosti stenózy. Opakované ruptury plátů bez tvorby okludujícího trombu a jejich následné hojení přispívá k přechodu tukových proužků ke složitějším fibrózním lézím (8, 39).

4. TGF- β

Nadrodina transformujícího růstového faktoru- β (TGF- β) zahrnuje více než 40 zástupců, např. TGF- β , diferenciační růstový faktor, BMP a další. Všechny jsou multifunkčními regulátory buněčného dělení, diferenciace, migrace, adheze, buněčné smrti, podporují tvorbu extracelulární matrix, tkáňovou homeostázu a embryogenezi (40). Zásadní role signální dráhy TGF- β v těchto procesech byla prokázána u myši cílenou inaktivací genů kódujících členy této dráhy (41). TGF- β má rozhodující roli v tkáňové homeostáze a jeho porucha se podílí na mnoha onemocněních včetně rakoviny, autoimunitních onemocnění a kardiovaskulárních chorobách.

Obrázek 9: Úloha TGF- β v různých onemocněních (40).



Byly identifikovány 3 izoformy TGF- β a to TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3. Pro kardiovaskulární systém je nejdůležitější TGF- β 1, který je přítomný v endoteliálních buňkách, cévních hladkých svalových buňkách, makrofázích a dalších krevních elementech. TGF- β 2 se nachází v epitelových a nervových buňkách a TGF- β 3 pak v buňkách mezenchymu (41). TGF- β 1 je silně protizánětlivý, imunosupresivní

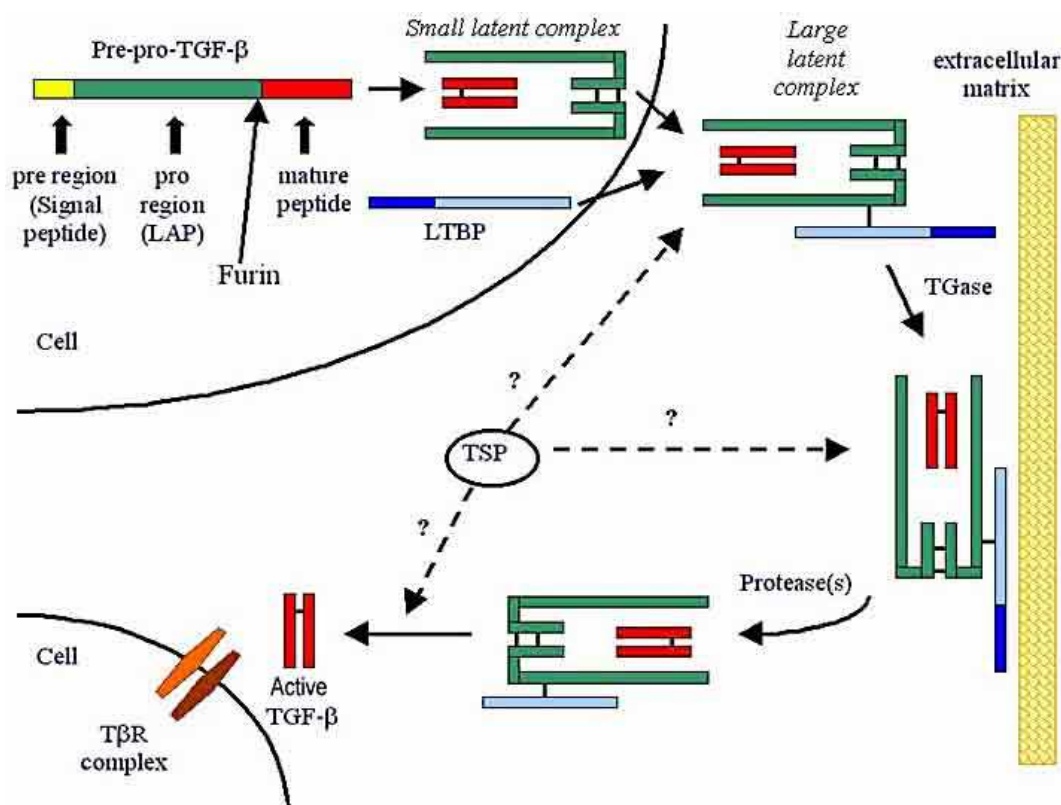
a profibrózní cytokin. Grainger a spol. (42) jako první prokázal, že hladiny TGF- β jsou významně sníženy u pacientů s pokročilou aterosklerózou. Při nadprodukci TGF- β bylo prokázáno snížení aterogeneze u pokusných zvířat, naopak snížení TGF- β 1 vede k proaterogenním změnám. Při použití anti-TGF- β 1 protilátek je pozorováno zvýšení zánětu, depozice lipidů a destabilizace aterosklerotického plátu (43).

4.1 Syntéza TGF- β

TGF- β je syntetizován jako neaktivní protein, nazývaný latentní TGF- β , který se skládá z hlavní části („mature peptide“) a latentního asociovaného peptidu (LAP). Latentní TGF- β je pak štěpen pomocí enzymů furinového typu a vzniká dimerní komplex známý jako malý latentní komplex (SLC). Následuje tvorba disulfidických můstků mezi zbytky cysteinu LAP a specifického proteinu vázajícího latentní TGF- β (LTBP) (40, 44). Tím vzniká velký latentní komplex (LLC). LTBP jsou proteiny s dvojí funkcí. Jsou důležité jednak pro sekreci SLC, jednak pro navázání TGF- β k extracelulární matrix (45). Jako součást LLC nemůže TGF- β interagovat se svým receptorem a musí být nejdříve aktivován.

Aktivace může probíhat proteolytickým štěpením, trombospondinem-1, plasminem, kyselým prostředím a některými matrixovými metalloproteinázami a β 6-integrinem (40). V hladkých svalových buňkách stimuluje AII expresi TGF- β a podporuje jeho konverzi na aktivní formu (46).

Obrázek 10: Schematické znázornění syntézy TGF- β .



<http://www.bioscience.org/2002/v7/d/gressner/figures.htm> (23.4.2010)

TSP = trombospondin, TGase = tkáňová transglutaminasa

4.2 TGF- β v patologii kardiovaskulárních nemocí

TGF- β se podílí na patogenezi mnoha KVO jako např. hypertenze, restenóza, ateroskleróza, hypertrofie srdce a srdeční selhání. Důležitými charakteristikami TGF- β jsou jeho protizánětlivé a profibrotické vlastnosti. TGF- β je považován v procesu aterosklerózy za protektivní cytokin. Hraje důležitou roli v udržování normální struktury cévní stěny a kontrole rovnováhy mezi zánětem a tvorbou extracelulární matrix. Ztráta tohoto protektivního vlivu může být spojena s poruchou TGF- β receptorů (40).

Ve zdravých cévách se častěji nachází TGF- β receptor typu 2. Prostřednictvím tohoto receptoru zvyšuje TGF- β expresi kontraktálních proteinů, ale ne tvorbu extracelulární matrix. Naproti tomu v nemocných cévách převažuje TGF- β receptor typu 1, který zvyšuje tvorbu extracelulární matrix a může podmiňovat brzkou tvorbu

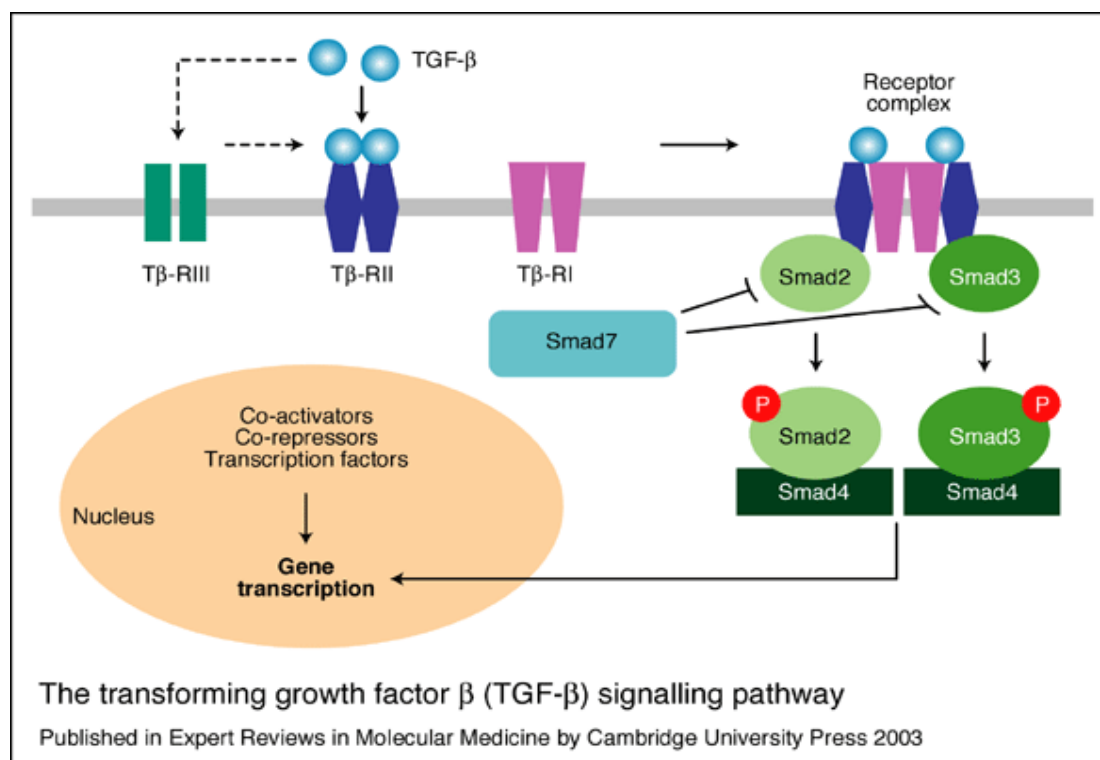
tukových proužků (47). TGF- β působí především na endotelové buňky, hladké svalové buňky, makrofágy a T-lymfocyty, tedy buňky účastnící se na tvorbě aterosklerotických lézí. TGF- β může stimulovat hladké svalové buňky k produkci kolagenu, čímž přispívá ke stabilizaci aterosklerotických plátů (40).

4.3 TGF- β receptory

Existují dva typy TGF- β receptorů, TGF- β receptor typu I (TGF- β RI) a TGF- β receptor typu II (TGF- β RII). Oba jsou to transmembránové receptory se serin/threonin-kinázovou aktivitou (40). Celková stavba obou typů receptorů je podobná. Jsou složeny z malé extracelulární části bohaté na cystein, jednoduché transmembránové oblasti a intracelulární části, která obsahuje serin / threonin kinázovou doménu (48).

TGF- β se váže na TGF- β RII, tím umožňuje dimerizaci s TGF- β RI a jeho fosforylaci, vedoucí k aktivaci Smad2 a Smad3. Tento proces může být inhibován Smad7. Aktivovaný Smad2 a Smad3 vytváří heterodimery se Smad4, které pronikají do jádra. Spolu s ko-aktivátory, ko-represory a dalšími transkripčními faktory reguluje Smad komplex genovou expresi (49).

Obrázek 11: Signální kaskáda TGF- β (49).



TGF- β RI je znám také jako „activin receptor-like“ kináza (ALK). U savců bylo popsáno 7 typů ALK (40). V souvislosti s tím může jeden ligand vyvolat více různých odpovědí v závislosti na expresi konkrétního typu ALK danou buňkou (50). ALK jsou spojovány s různými poruchami jako je kancerogeneze, hereditární hemoragická teleangiektázie (HHT), imunitní a renální onemocnění či kostní malformace. Proto mohou být tyto receptory využity jako cílové struktury zásahu různých léčiv (51).

V cévním systému se nejčastěji vyskytují ALK1 a ALK5, přičemž ALK1 aktivuje Smad 1/5 a ALK5 naopak Smad 2/3. To hraje důležitou roli v kontrole proliferace a migrace endoteliálních buněk během angiogeneze. Zatímco ALK1 stimuluje proliferaci a migraci endoteliálních buněk, ALK5 tento proces inhibuje (48). Co se týká lokalizace ALK v krevních cévách, nacházíme ALK1 spíše v buňkách endotelu, zatímco ALK5 je detekovatelná v tunica media a adventitia krevních cév (40).

Dalším typem receptoru je TGF- β receptor typu III, který zahrnuje endoglin a betaglykan. Jsou to strukturálně podobné bílkoviny, které mají nepřímou úlohu v transdukcii signálu vyvolaného TGF- β . Oba proteiny jsou transmembránové receptory s krátkými intracelulárními doménami, které nemají enzymatickou aktivitu, ale obsahují mnoho zbytků serinu a threoninu. Důležitou funkcí betaglykanu je usnadnění vazby TGF- β na TGF- β RII. To je zvláště důležité pro TGF- β 2, který má pouze nízkou vazebnou afinitu k TGF- β RII. Velké cévy, které neexprimují betaglykan, odpovídají mnohem silněji na TGF- β 1 a TGF- β 3 než TGF- β 2 (48).

Endoglin, označovaný také jako CD105, je součástí receptoru pro TGF- β (52). Má schopnost vázat hlavně TGF- β 1 a TGF- β 3. Vyskytuje se ve dvou izoformách jako L- a S-endoglin lišících se v počtu aminokyselin v jejich cytoplasmatické části receptoru. Narozdíl od betaglykanu nemůže endoglin vázat TGF- β bez účasti TGF- β RII (53). Ve vysokém množství je exprimován na povrchu endoteliálních buněk, méně pak na monocytech, erytroidních prekurzorech aj. (54).

4.4 Smad proteiny

Smad proteiny jsou stěžejní intracelulární mediátory, které přenáší signál vyvolaný TGF- β do jádra buněk. Smad byly objeveny pomocí genetických studií prováděných na *Drosophila* a *Caenorhabditis elegans*. Rodina Smad proteinů může být dále rozdělena na 3 podskupiny. Jedná se o receptory-regulované Smads (R-Smads),

„common-partner“ Smads (Co-Smads), které vytvářejí komplexy s R-Smads, a inhibitory Smads (I-Smads).

Aktivovaný TGF- β RI interaguje a fosforyluje R-Smads. Tyto se pak spojují s Co-Smads do komplexů, které pronikají do jádra. Tam se váží na DNA buď přímo, nebo nepřímo prostřednictvím dalších bílkovin a regulují transkripci cílových genů (55). I-smads interagují s aktivovaným TGF- β RI a tím zabrání R-Smads v přístupu k tomuto receptoru. Hlavním inhibítozem TGF- β je Smad7.

Výzkumy poukazují i na možnou existenci TGF- β signalizace nezávislé na Smad a naopak Smad proteiny mohou být aktivovány jinými faktory než jen TGF- β (40).

5. MODELÝ ATEROSKLERÓZY

Jako modely pro výzkum aterosklerózy se používají zvířata, která vytvářejí aterosklerotické pláty podobné lidským. Výběr zvířecího modelu musí být přizpůsoben záměru experimentu. Pokud se tedy bude jednat o výzkum hemodynamiky, je lepší mít k dispozici větší cévy, zatímco u histopatologického výzkumu je výhodné použít myši, jejichž cévy jsou pak rozděleny na malé řezy (56).

Zvířecí modely aterosklerózy vytváří léze buď spontánně nebo po určitém zásahu jako je dietní, mechanická, chemická nebo imunologická indukce. Umožňují za kontrolovaných podmínek studium mechanismů aterosklerotického procesu, účinků různých intervencí i studium vývoje či regrese onemocnění. Tyto modely již poskytly cenné informace o diagnostických a léčebných strategiích s možností následného zkoumání změn v arteriální stěně po aplikaci těchto postupů (57).

Ke studiu aterosklerózy bylo použito již mnoho druhů zvířat, z nichž každé má své výhody a nevýhody. Vůbec první experimenty byly provedeny v roce 1908, kdy Ignatowski (58) poukázal na ztlustění intimy u králíků krmených stravou bohatou na živočišné proteiny (maso, vejce, mléko).

Původně byli používáni hlavně primáti, prasata a králíci, příležitostně i křečci a holubi. Například králíci sice nevytvářejí spontánně aterosklerózu, ale jsou snadno ovlivnitelní stravou s obsahem cholesterolu a vytvářejí léze v krátkém čase. Léze ale obsahují mnohem více lipidů a makrofágů než u lidí. Velmi dobrý model je prase, které při krmení stravou bohatou na cholesterol vytváří léze podobné těm, které se nacházejí u lidí. Nevýhodou tohoto modelu je ale cena a problematika chovu. Proto bylo potřeba najít malý, geneticky reprodukovatelný model, kterým se stala myš (59).

5.1 Myší modely aterosklerózy

Obecně jsou myši poměrně rezistentní k rozvoji aterosklerózy, což vyplývá z jejich vysokých plazmatických hladin antiaterogenního HDL a nízkých hladin proaterogenního LDL a VLDL (60). Jedinou výjimkou je kmen C57BL/6, který při krmení stravou bohatou na cholesterol a choleovou kyselinu vytváří sice léze, ale odlišné od lidských co se týká histologie a lokalizace (59). Všechny současné modely

pro aterosklerózu jsou založeny na porušení metabolismu lipoproteinů prostřednictvím stravovacích návyků či genetické manipulace (60).

Vůbec první myší model aterosklerózy byl použit během 60. let 20. století ve Wisslerově laboratoři. Byla použita speciální dieta obsahující 30% tuku, 5% cholesterolu a 2% kyseliny cholové, která způsobila aterosklerózu u C57BL/6 myší (59). Vzhledem k toxicitě této stravy Paigen a spol. vytvořil dietu obsahující 15% tuku, 1,25% cholesterolu a 0,5% kyseliny cholové (61), která se ovšem také neosvědčila a to hlavně vzhledem k nefyziologicky vysokému obsahu cholesterolu a obsahu kyseliny cholové.

Paigen a spol. také vyvinuly metody ke kvantifikaci aterosklerózy u myších modelů. Nejvíce se používá metoda měření průřezu léze v kořeni aorty (62), kdy se srdce krájí na tenké řezy na přesně anatomicky definovaných místech (v aortálním sinu a oblasti chlopní) a tyto léze se pak měří mikroskopicky.

Myši jsou velmi dobrým modelem, ale je třeba brát v úvahu i některé rozdíly ve vztahu k lidem. Liší se v délce života, tělesné hmotnosti, ale i například v odlišném spektru lipidů, kdy u myší je nejvyšší zastoupení protektivního HDL cholesterolu. Proto myši krmené normální nízkotučnou dietou nedostanou aterosklerózu. Výhodným rozdílem mezi zvířecími modely a lidmi je možnost kontroly prostředí a stravy během těchto studií, což není možné u dlouhodobých studií u lidí. K výhodám těchto modelů patří též možnost chovat myši ve velkých skupinách a rychlá tvorba aterosklerózy. Hlavní nevýhodou myších modelů je jejich malá velikost ztěžující provádění chirurgických postupů a zobrazování *in vivo*. Rozvojem techniky dochází ale k překonání těchto nedostatků, stejně tak jsou umožněny i další postupy jako např. možnost zobrazování břišních aterosklerotických lézí v živé myši či chirurgické podvázání koronární artérie vedoucí k ischemii myokardu (59).

5.1.1 Typy geneticky modifikovaných myších modelů

1) *ApoE*- deficitní (*ApoE*^{-/-}) myši:

Jedná se o myši s inaktivovaným genem pro apoE, které byly poprvé použity v roce 1992. ApoE je glykoprotein syntetizovaný v játrech a v makrofázích a má řadu důležitých antiaterogenních funkcí. Je součástí všech lipoproteinů s výjimkou LDL a slouží jako ligand pro LDL-receptor a receptor pro zbytky chylomikronů, čímž dochází k vychytávání těchto částic v játrech.

Homozygotní apoE-deficitní myši se významně odlišují od normálních myší. Lze pozorovat výraznou změnu v jejich hladinách lipidů a lipoproteinů. ApoE-deficitní myš má až pětinasobně zvýšené hladiny celkového cholesterolu, přičemž HDL dosahuje pouze 45% normálních hodnot.

Myši mají oproti lidem přirozeně vysoké hladiny HDL a nízké hladiny LDL. U těchto zvířat chybí speciální protein pro transport esterů cholesterolu z HDL do VLDL a LDL. I přesto mají apoE-deficitní myši podobný fenotyp jako apoE-deficitní lidé (59). Tyto myši vytváří spontánně aterosklerotické léze a to i při standardní dietě obsahující malé množství tuku a žádný cholesterol. Tyto léze jsou srovnatelné s lidskými a jsou vytvářeny v plném rozsahu od tukových proužků až ke komplikovaným lézím (59, 60). Typicky se skládají z nekrotického jádra, proliferujících hladkých svalových buněk a extracelulární matrix. U starších myší se nacházejí i kalcifikovaná ložiska (59).

Tvorbu aterosklerotických lézí lze značně urychlit dietou bohatou na cholesterol. Výhodná je „western-type“ dieta, jejíž složení je podobné průměrné americké stravě a obsahuje 21% tuku a 0,15% cholesterolu.

2) LDL receptor-deficitní ($LDLr^{-/-}$) myši:

Myši, kterým chybí gen pro LDL receptor, vykazují jen mírně zvýšené plazmatické hladiny cholesterolu při podávání normální stravy a ateroskleróza se vyvíjí pomalu. Úpravou stravy na vysokotučnou s obsahem cholesterolu dochází k rychlému rozvoji aterosklerózy se značnou převahou LDL cholesterolu v lipoproteinovém spektru. Mutace v genu pro LDL receptor u lidí se projevuje jako familiární hypercholesterolémie (60).

3) Myši s dvojitým deficitem apoE a LDL receptoru ($apoE^{-/-}/LDLr^{-/-}$):

Jedná se o nový model aterosklerózy vytvářející aterosklerotické léze rychleji a ve větší míře než předchozí modely (63). Navíc zde není nutnost podávat aterogenní dietu (59).

6. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodiku pro detekci TGF- β RI konkrétně jeho subtypu ALK-5. Sledovali jsme jeho expresi v kořenu aorty u apoE/LDLr-deficientních myší u zvířat, kterým byla podávána standardní nebo cholesterolová dieta.

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru, vážící 15-20 gramů, byly zakoupeny v Jackson Laboratories (USA) a ustájeny ve zvěřinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

7.1 Zvířata a předepsaná dieta

Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Jedna skupina (n=8) byla krmena pouze standardní dietou a byla utracena ve věku 16 týdnů života. Druhá skupina (n=8) byla po 8 týdnech standardní diety krmena dalších 8 týdnů aterogenní dietou s obsahem 0,15% cholesterolu.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vylačněna a bylo provedeno usmrcení předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C.

7.2 Biochemická analýza

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

7.3 Histologické barvení olejovou červení

Barvení olejovou červení se používá k detekci lipidů ve tkáních. Zde byla tato metodika použita pro stanovení množství lipidů v aterosklerotických lézích.

Postup barvení olejovou červení:

Barvení Oil Red O:

- | | |
|-----------------------------|------------------|
| 1) Oil Red O | 15 minut |
| 2) pramenitá voda | oplach |
| 3) Gill hematoxylin | asi 5 sekund, RT |
| 4) pramenitá voda | modrání 1 minuta |
| 5) montování nevodné medium | |

Zásobní roztok Oil Red O se připraví rozpuštěním 0,5 g Oil Red O ve 100 ml isopropanolu. Pracovní roztok se připravuje v čas potřeby z 60 ml zásobního roztoku smíchaného se 40 ml destilované vody a filtruje se přes papírový filtr.

7.4 Imunohistochemie

Veškerá imunohistochemická barvení byla provedena na cévách získaných z geneticky modifikovaného kmene myši. Jednalo se o samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru vážící 15-20 gramů.

Odebrané segmenty tkáně tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C. Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu.

Pro detekci exprese ALK-5 byla použita metodika EnVision s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

Primární protilátky

K detekci exprese markeru ALK-5 v cévní stěně byla použita pro světelnou mikroskopii monoklonální protilátka Rabbit anti-mouse ALK-5 ve zředění 1/300 (*Sigma Aldrich, Německo*).

Sekundární protilátky

Jako sekundární protilátka byla pro světelnou mikroskopii použita monoklonální protilátka Goat anti-rabbit - EnVision (*DAKO, Carpinteria, USA*).

Detekční systémy

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu byl použitý diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, *DAKO, Carpinteria, USA*).

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (*Vitana Corp., USA*) za pomoci softwaru NIS (*Laboratory Imaging Prague, Česká republika*).

Pracovní postup - EnVision systém

Tkáňové řezy byly přeneseny na sklíčka předem upravená v roztoku želatiny. Po oschnutí (60 minut) se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v minus 20°C. Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Po patnáctiminutovém usušení se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut).

Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné zablokovat nespecifická vazebná místa třicetiminutovou inkubací s 10% roztokem goat séra (*Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo*) v PBS.

Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovala s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut) a dále do 3% H₂O₂ (15 minut). Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy 30 minut inkubovaly se sekundární protilátkou

anti-rabbit EnVision a opět se vložily do roztoku PBS (2x5 minut).

K vizualizaci navázané protilátky se použil chromogen DAB (DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton-xylen (10:1) (3 minuty), aceton-xylen (1:10) (3 minuty) a v xylen (3 x 2 minuty). Na závěr byla sklíčka zamontována do Eukittu.

Pracovní postup

EnVision systém – detekce exprese ALK-5

- 1) sušení tkáňových řezů v termostatu (60min)
- 2) fixace v acetonu (-20°C; 30min)
- 3) oschnutí řezů (15min)
- 4) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 5) aplikace 10% blokujícího zvířecího séra (30 min)
- 6) aplikace primární protilátky (inkubace 60 min)
- 7) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 8) promytí v 3% H₂O₂ (15 min)
- 9) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 10) aplikace sekundární protilátky (inkubace 30 min)
- 11) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 12) inkubace s roztokem chromogenu (DAB) (doba inkubace různá pro každou protilátku)
- 13) oplach řezů v acetonu
- 14) odvodnění řezů (aceton)
- 15) odvodnění řezů (aceton-xylen 10/1) (3 min)
- 16) odvodnění řezů (aceton-xylen 1/10) (3 min)
- 17) odvodnění řezů (xylen) (3 x 2 min)
- 18) montování řezů do Eukittu

7.5 Statistická analýza

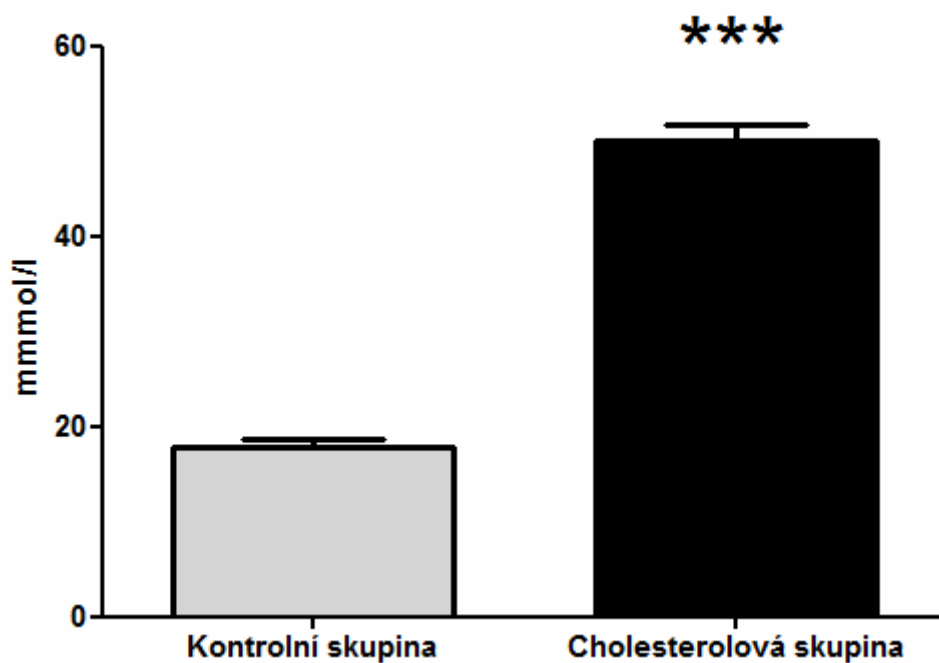
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u cholesterolové a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad Prism software (verze 4.0).

8. VÝSLEDKY

8.1 Biochemická analýza

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu. Výsledky zcela dle očekávání ukázaly výrazný a významný nárůst hladin cholesterolu u myší, kterým byla podávána dieta s obsahem cholesterolu ve srovnání se skupinou na standardní dietě ($***P \leq 0,001$) (viz graf 1).

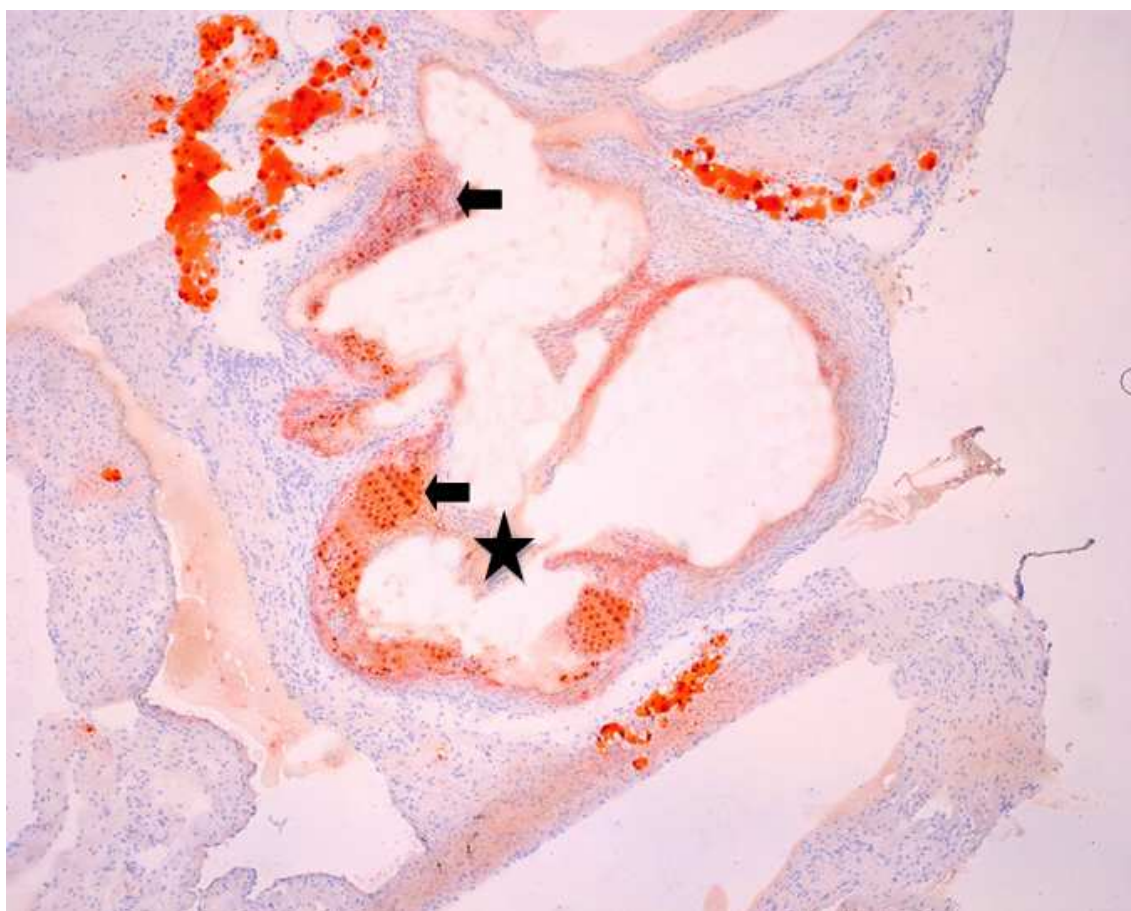
*Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myší. Signifikantní nárůst je pozorován u cholesterolové skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou ($***P \leq 0,001$).*



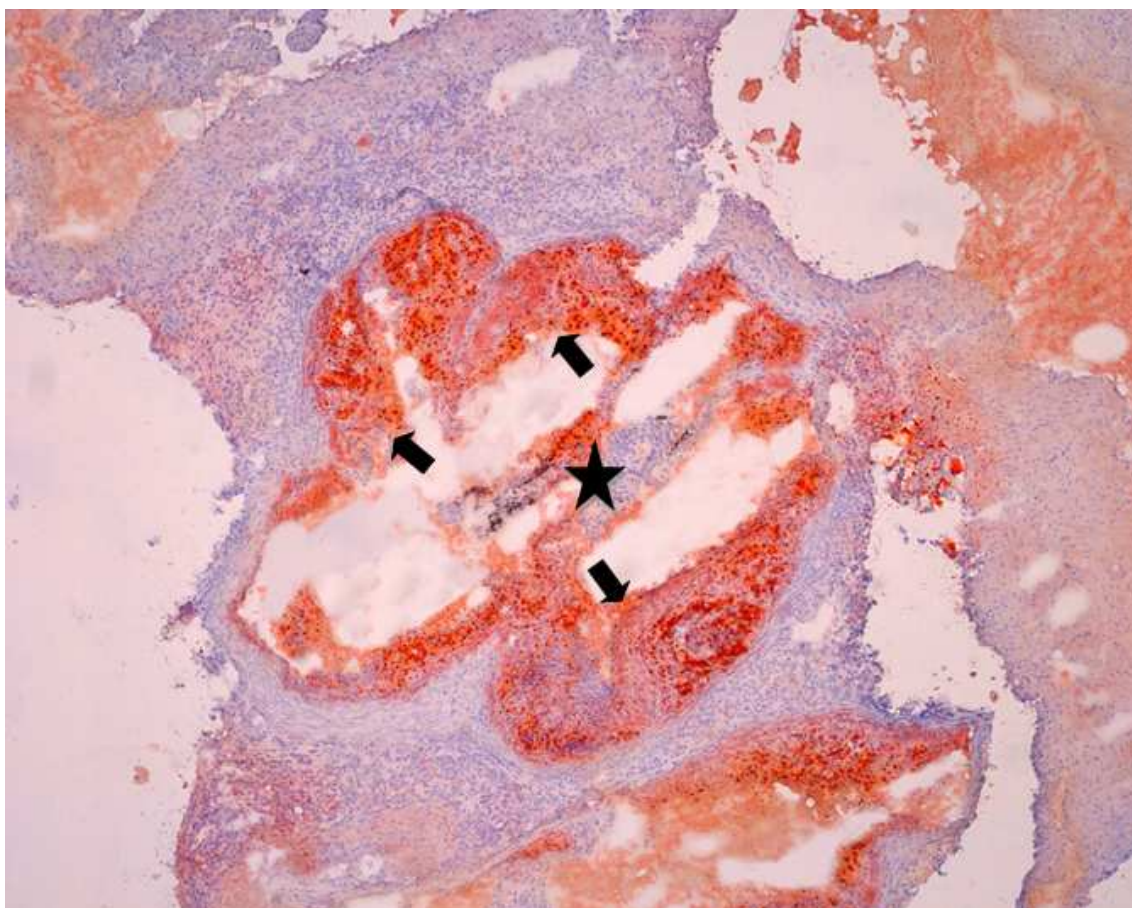
8.2 Histologické barvení olejovou červení

Barvení olejovou červení bylo provedeno za účelem kvantifikace velikosti aterosklerotických plátů u myší krmených standardní dietou a u myší krmených cholesterolovou dietou. U všech řezů v kontrolní i cholesterolové skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí (obr. 12 a 13). Léze byly největší v oblasti aortálního sinu, ale pokračovaly také v oblasti aortálního oblouku. Aterosklerotické léze byly výrazně vyvinuty, přičemž u řady z nich byla již nalezena ateromová nekrotická jádra. Velikost lézí byla výraznější u zvířat z cholesterolové skupiny (obr. 13).

Obrázek 12: *Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení u kontrolní skupiny zvířat, kterým byla podávána standardní dieta. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní (hvězdička). Zvětšení preparátu 40x.*



Obrázek 13: *Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení u cholesterolové skupiny zvířat, kterým byla podávána dieta s obsahem cholesterolu. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní (hvězdička). Intenzita a plocha barvení olejovou červení je zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvětšení preparátu 40x.*

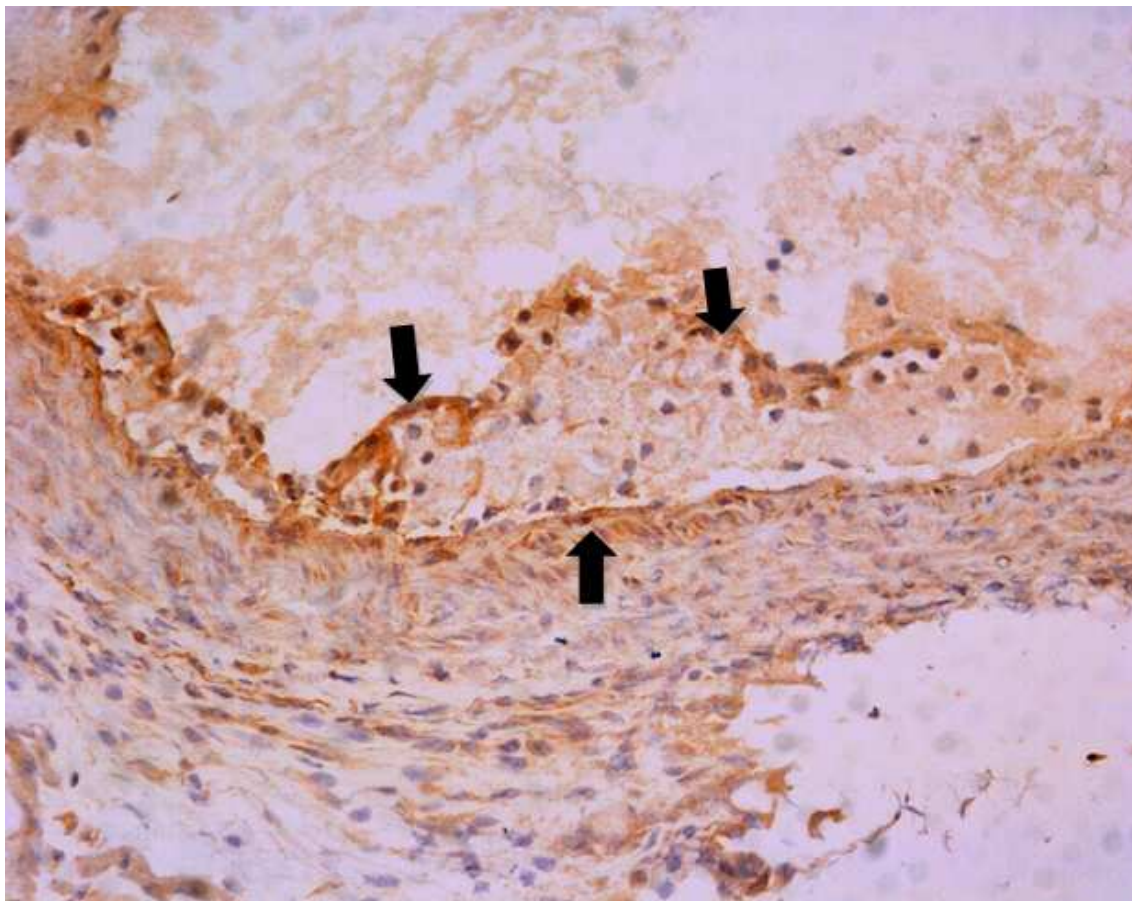


8.3 Imunohistochemická analýza

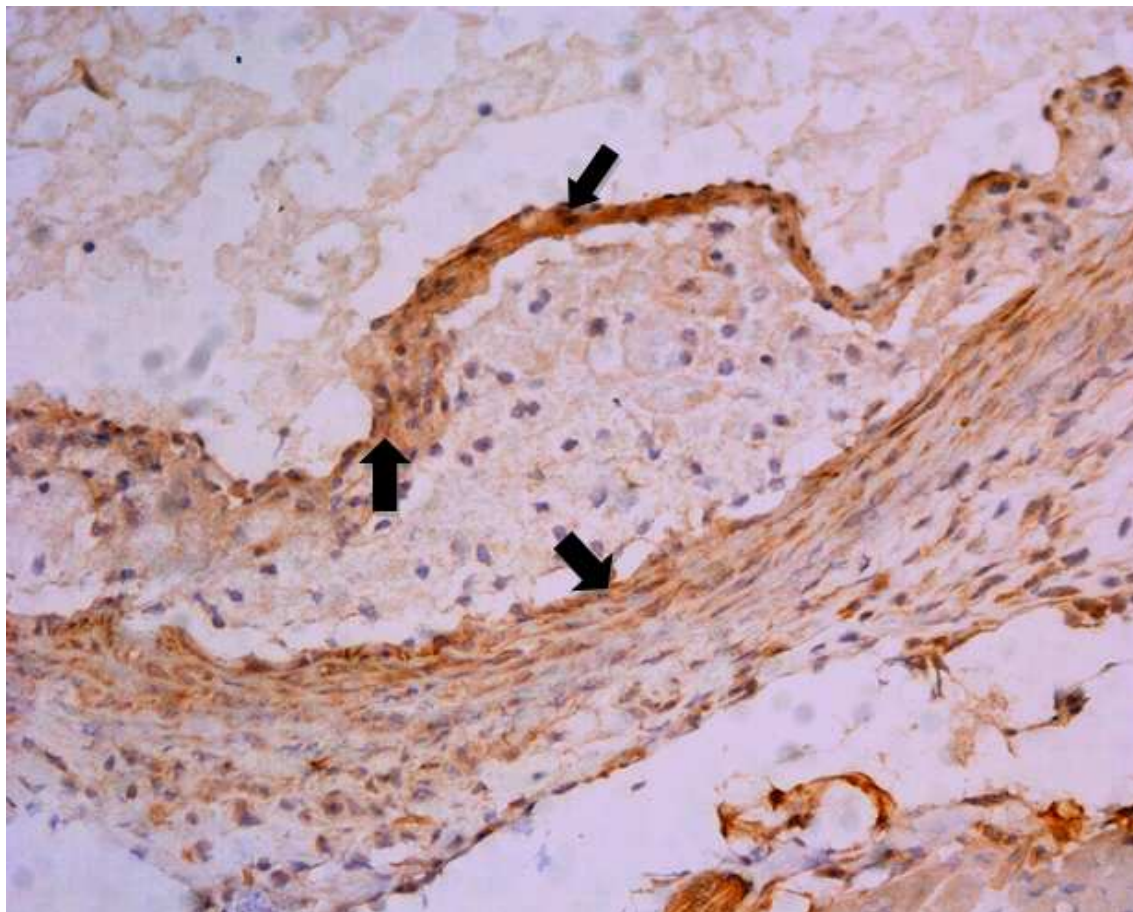
Imunohistochemické barvení ALK-5 v oblasti aortálního sinu

Imunohistochemická analýza exprese ALK-5 prokázala výraznou expresi ALK-5 v oblasti tunica media. Zde šlo zejména o expresi hladkými svalovými buňkami. Dále byla exprese pozorována v aterosklerotických plátech (obr. 14 a 15). Zde byla exprese často lokalizována v horních částech plátů v místech s vyšší buněčnatostí. Žádná exprese nebyla detekována na cévním endotelu. Při srovnání exprese u kontrolní a cholesterolové skupiny jsme nepozorovali výrazné rozdíly mezi těmito skupinami, a to ani z hlediska intenzity, ani z hlediska rozložení exprese ALK-5 (obr. 14 a 15).

Obrázek 14: Reprezentativní obrázek barvení ALK-5 u kontrolní skupiny zvířat. Silná exprese je viditelná v medii cév (šipky). Další oblast exprese je soustředěna také do oblasti aterosklerotických plátů, zejména v jeho horní části. Zvětšeno 200x.



Obrázek 15: Reprezentativní obrázek barvení ALK-5 u cholesterolové skupiny zvířat. Silná exprese je viditelná v medii cév (šipky). Další oblast exprese je soustředěna také do oblasti aterosklerotických plátů, zejména v jeho horní části. Není zde patrný výrazný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvětšeno 200x.



9. DISKUZE

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují až v pozdějších letech života, jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze (64).

Nadrodina transformujícího růstového faktoru- β (TGF- β) zahrnuje více než 40 zástupců, např. TGF- β , diferenciační růstový faktor, BMP a další. Všechny jsou multifunkčními regulátory buněčného dělení, diferenciace, migrace, adheze, buněčné smrti, podporují tvorbu extracelulární matrix, tkáňovou homeostázu a embryogenezi (40). Zásadní role signální dráhy TGF- β v těchto procesech byla prokázána u myši cílenou inaktivací genů kódujících členy této dráhy (41). TGF- β má rozhodující roli v tkáňové homeostáze a jeho porucha se podílí na mnoha onemocněních včetně rakoviny, autoimunitních onemocnění a kardiovaskulárních chorobách.

Byly identifikovány 3 izoformy TGF- β a to TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3. Pro kardiovaskulární systém je nejdůležitější TGF- β 1, který je přítomný v endoteliálních buňkách, cévních hladkých svalových buňkách, makrofázích a dalších krevních elementech. TGF- β 1 je silně protizánětlivý, imunosupresivní a profibrotický cytokin. Grainger a spol. (42) jako první prokázal, že hladiny TGF- β jsou významně sníženy u pacientů s pokročilou aterosklerózou. Při nadprodukci TGF- β bylo prokázáno snížení aterogeneze u pokusných zvířat, naopak snížení TGF- β 1 vede k proaterogenním změnám. Při použití anti-TGF- β 1 protilátek je pozorováno zvýšení zánětu, depozice lipidů a destabilizace aterosklerotického plátu (43).

Existují dva typy TGF- β receptorů, TGF- β receptor typu I (TGF- β RI) a TGF- β receptor typu II (TGF- β RII). Oba jsou to transmembránové receptory se serin/threonin-kinázovou aktivitou (40). Celková stavba obou typů receptorů je podobná. Jsou složeny z malé extracelulární části bohaté na cystein, jednoduché transmembránové oblasti a intracelulární části, která obsahuje serin / threonin kinázovou doménu (48). TGF- β RI

je znám také jako „activin receptor-like“ kináza (ALK). U savců bylo popsáno 7 typů ALK.

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodiku pro detekci ALK-5 v kořenu aorty u apoE/LDLr-deficientních myší u zvířat, kterým byla podávána standardní nebo cholesterolová dieta.

Výsledky biochemické analýzy a analýzy velikosti aterosklerotických plátů ukázaly, že podávání cholesterolu ve stravě dle očekávání vedlo ke zvýšení hladin celkového cholesterolu i velikosti aterosklerotických plátů.

Imunohistochemická analýza exprese ALK-5 prokázala výraznou expresi ALK-5 v oblasti tunica media. Zde šlo zejména o expresi hladkými svalovými buňkami. Tyto výsledky potvrzují předešlá data (65). Dále byla exprese pozorována v aterosklerotických plátech. Zde byla exprese často lokalizována v horních částech plátů v místech s vyšší buněčností. Žádná exprese nebyla detekována na cévním endotelu. Při srovnání exprese ALK-5 u kontrolní a cholesterolové skupiny jsme nepozorovali výrazné rozdíly mezi skupinami, a to ani z hlediska intenzity, ani z hlediska rozložení exprese ALK-5.

Tyto výsledky tedy ukazují na to, že hladiny cholesterolu pravděpodobně nehrají významnou roli v expresi ALK-5. Také se zdá, že ani velikost plátů nemá výrazný efekt na expresi ALK-5. Jinak řečeno ALK-5 neovlivňuje velikost aterosklerotických plátů. V současné době není mnoho studií, které by sledovaly expresi ALK-5 v aterosklerotických plátech myší. Z tohoto důvodu můžeme teď pouze spekulovat o vlivu ALK-5 na proces aterogeneze. Nicméně je nutno říci, že aktivace TGF- β 1 kaskády, včetně aktivace obou receptorů byla jasně prokázána jako zásadní pro vytvoření stabilního plátu u myšího modelu aterosklerózy (43). Z toho ovšem také vyplývá, že exprese ALK-5 by mohla přispívat ke změně fenotypu plátu z nestabilního plátu na stabilní. Tato hypotéza však musí být dále ověřena, neboť jsme tento parametr v této diplomové práci nestudovali.

Závěrem lze tedy konstatovat, že exprese ALK-5 nebyla ovlivněna hladinami cholesterolu ani velikostí aterosklerotických plátů, což naznačuje, že ALK-5 se zřejmě

nepodílí na zvětšování velikosti aterosklerotických plátů, nicméně to nevylučuje možnost, že se může podílet na stabilizaci aterosklerotických plátů.

10. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodiku pro detekci ALK-5 v kořenu aorty u apoE/LDLr-deficientních myší u zvířat, kterým byla podávána standardní nebo cholesterolová dieta.

Výsledky biochemické analýzy a analýzy velikosti aterosklerotických plátů ukázaly, že podávání cholesterolu dle očekávání vedlo ke zvýšení hladin celkového cholesterolu a i velikosti aterosklerotických plátů.

Imunohistochemická analýza exprese ALK-5 prokázala výraznou expresi ALK-5 v oblasti tunica media a v aterosklerotických plátech. Pokud srovnáme expresi u kontrolní a cholesterolové skupiny tak jsme nepozorovali výrazné rozdíly mezi skupinami a to ani z hlediska intenzity ani z hlediska rozložení exprese ALK-5.

Závěrem lze tedy konstatovat, že exprese ALK-5 nebyla ovlivněna hladinami cholesterolu ani velikostí aterosklerotických plátů, což naznačuje, že ALK-5 se zřejmě nepodílí na zvětšování velikosti aterosklerotických plátů, nicméně to nevylučuje možnost, že se může podílet na stabilizaci aterosklerotických plátů.

11. SEZNAM ZKRATEK

AII	angiotenzin II
AGE	produkt pozdní glykace
ALK	aktivin receptor-like kináza
ApoB	apolipoprotein B
ApoE	apolipoprotein E
ApoE ^{-/-}	apoE deficitní myši
ApoE ^{-/-} /LDLr ^{-/-}	myši deficitní pro ApoE i LDL-receptor
BFGF	základní růstový faktor fibroblastů, basic fibroblast growth factor
BMI	body-mass index
BMP	kostní růstový protein, bone morphogenetic protein
CMP	cévní mozková příhoda
Co-Smads	„common-partner“ Smads
CRP	C-reaktivní protein
DAB	diaminobenzidín
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HHT	hereditární hemoragická teleangiektázie
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula
IL-1	interleukin-1
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHs	ischemická choroba srdeční
I-Smads	inhibitory Smads
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LAP	latentní asociovaný peptid
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LDLr	LDL-receptor
LDLr ^{-/-}	LDL-receptor deficitní myš
LLC	velký latentní komplex
Lp(a)	lipoprotein (a)
LTBP	protein vázající latentní TGF-β
MCP-1	monocyty přitahující protein
MMPs	matrixové metaloproteinasy
MG-CSF	faktor stimulující kolonie makrofágů a granulocytů

NF- κ B	nukleární faktor kappa-B
NO-syntáza	syntáza oxidu dusnatého
oxLDL	oxidovaný LDL
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu-1
PBS	fosfátový pufr
PDGF	destičkový růstový faktor
RAGE	receptor pro pozdní produkty glykace
R-Smads	receptory-regulované Smads
SCORE	odhad koronárního rizika, systematic coronary risk evaluation
SLC	malý latentní komplex
Smad	intracelulární mediátory zprostředkující signalizaci TGF- β
TAG	triacylglyceroly
TGF- β RI, TGF- β RII	receptor pro TGF- β typu I a typu II
TGF- β	transformující růstový faktor- β
TK	krevní tlak
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
VCAM-1	adhezní molekula-1 cévních buněk
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě

12. POUŽITÁ LITERATURA

1. Vlček J, Fialová D: *Klinická farmacie I.*, Grada, Praha 2010, s.108-120, ISBN 978-80-247-3169-8
2. Vojáček J, Malý M a kol.: *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*, Grada, Praha 2004, s.21-42, ISBN 80-247-0501-X
3. Baumhoer D, Steinbrück I, Götz: *Kurzlehrbuch histologie*, Urban&Fischer, 2003, s. 91-98, ISBN 3-437-42231-6
4. Paulsen DF: *Histologie a buněčná biologie*; H&H Vyšehradská 2004, s.158-162, ISBN 80-7319-024-9
5. Linß W, Fanghänel J: *Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie*, Walter de Gruyter, 1998, s. 95-101, ISBN 3-11-014032-2
6. Lüllmann-Rauch R: *Taschenlehrbuch Histologie*, Thieme, 2006, s.244-250, ISBN 3-13-129242-3
7. Fruchart JC, Duriez P: Fundamental data on atherosclerosis, *Ann Endocrinol* (Paris) 62: 93-100, 2001
8. LaRosa JC: *Medical Management of atherosclerosis*, Marcel Dekker Inc., 1998, ISBN 0-8247-0149-6
9. Fan J, Watanabe T: Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis, *J Atheroscler Thromb* 2003, 10: 63-71
10. Werner N, Böhm M: HDL cholesterol in the atherosclerotic disease; *E-journal of cardiology practice*, Vol.6, 2008
11. Celemajer DS: Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997, 30: 325-333
12. Piřha J, Roztočil K, Cířková R, et al.: Endoteliální dysfunkce a její hodnocení, *Cor Vasa* 2001, 43: 452-456
13. Bultas J, Cířková R, Čeřka R, et al.: *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční*, Praha, Galén 1999, 127s., ISBN 8072620266
14. Čeřka R: *Cholesterol a ateroskleróza. Léčba hyperlipidemií*, Praha, Maxdorf 1999, 226s.
15. Gregor P, Widimský P, et al.: *Kardiologie*, Praha, Galén 1999, 595s., ISBN 8072620215

16. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A: Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23: 168-175
17. Lusis A: Atherosclerosis, *Nature* 2000, 407: 233-241
18. Fejfar Z, Přerovský I: *Klinická fyziologie krevního oběhu*, Galén 2002, 361s., ISBN 8072621300
19. Strydom HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME Jr., Schaffer SA, Schwarz CJ, Wagner WD and Wissler RW: A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American heart association, *Circulation* 1994, 89: 2462-2478
20. Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of advanced type of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis; *Circulation* 1995; 92: 1355-1374
21. Wu L, Fan J, Matsumoto S and Watanabe T: Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 269: 808-815
22. Østerud B, Bjørklid E: Role of Monocytes in Atherogenesis, *Physiol. Rev.* 2003, 83: 1069-1112
23. Altman R: Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point, *Thrombosis Journal*, 2003
24. Štulc T: Aterogeneze a její patogenetické mechanismy, *Kardiologické fórum* 2006, 4:14-15
25. Evans M, Khan N, Rees A: Diabetic dyslipidaemia and coronary heart disease: new perspectives, *Curr Opin Lipidol* 1999, 10: 387-391
26. Pandolfi A, Cetrullo D, Polishuck R, et al.: Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects, *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2001, 21: 1378-1382
27. Chobanian AV, Dzau VJ: Vascular smooth muscle and atherosclerotic vascular disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. Atherosclerosis and coronary artery disease, Vol.1, Philadelphia: *Lippincott-Raven* 1996, 237-42
28. Swei A, Lacy F, Delano FA, Schmidt-Schönbein GW: Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat, *Hypertension* 1997, 30: 1628-1633

29. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, et al.: Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adult, *JAMA* 1999, 282: 2131-2135
30. Soriano-Guillen L, Hernandez-Garcia B, Pita J, Dominguez-Garrido N, Del Rio-Camacho G, Rovira A: High-sensitivity C-reactive protein is a good marker of cardiovascular risk in obese children and adolescents.. *Eur J Endocrinol* 2008, 159: R1-R4
31. Brustolin S, Giugliani R, Félix TM: Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders, *Braz J Med Biol Res* 2010, 43: 1-7
32. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease, *N Engl J Med* 1999, 340: 115-126
33. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med.* 1989; 114:473-501
34. Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH: Homocysteine as a risk factor for vascular disease : enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells, *Arterioscl Thromb Vas* 1997, 17: 2074-2081
35. Vannucchi H, Melo SS: Hyperhomocysteinemia and cardiometabolic risk, *Arq Bras Endocrinol metabol* 2009, 53: 540-9
36. Pepine CJ, Schlaifer JD, Mancini GB, Pitt B, O'Neill BJ, Haber HE: Influence of smoking status on progression of endothelial dysfunction. TREND Investigators. Trial on reversing endothelial dysfunction, *Clin Cardiol* 1998, 21: 331-334
37. Danech J, Collins R, and Peto R: Chronic infections and coronary heart disease: is there a link?, *Lancet* 1997, 350: 430-436
38. Tonkin A: *Atherosclerosis and heart disease*, Martin Dunitz, an imprint of Taylor&Francis Group plc., 2003, ISBN 1-84184-123-4
39. Teiger E: Physiopathology of unstable angina, *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2001, 50: 359-65
40. Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J: TGF- β signaling in vascular fibrosis, *Cardiovascular Research* 2007, 74: 196-206
41. Blobe GC, Schiemann WP, Lodisch HF: Role of transforming growth factor β in human disease; *N Engl J Med* 2000, 342: 1350-1358

42. Grainger DJ, Kemp BR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, Grace AA, Schonfield PM, and Chauhan A: The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nature Med* 1995, 1: 74-79
43. Mallat Z, Gojova A, Marchinol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, and Tedgui A: Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotyp in mice, *Circ Res* 2001, 89: 930-934
44. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB: Making sense of latent TGF- β activation, *Journal of Cell Sciences* 2003, 116: 217-224
45. Saharinen S, Hyytiäinen M, Taipale J and Keski-Oja J: Latent transforming growth factor- β binding proteins (LTBPs) – structural extracellular matrix proteins for targeting TGF- β action; *Cytokine&Growth Factor reviews* 1999, 10: 99-117
46. Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Häring HU, Schleicher ED: Angiotensin II induces human TGF- β 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia, *Diabetologia* 2002; 45: 890-8
47. Grainger DJ: Transforming growth factor-b and atherosclerosis: so far so good for the protective cytokine hypothesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:399-404
48. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P: TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 2005; 65:599-608
49. http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_05/S1462399403005684sup008.htm (23.4.2010)
50. Grainger DJ: TGF- β and atherosclerosis in man; *Cardiovasc Res* 2007, 74: 213-222
51. Graham H, Peng C: Activin receptor-like kinases: structure, function and clinical implications; *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006, 6: 45-58
52. Lebrin F, Goumans MJ, Junker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P: Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction; *EMBO J* 2004, 23: 4018-28

53. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P: Transforming growth factor- β signal transduction in angiogenesis and vascular disorders; *Chest* 2005, 128: 585-590
54. Chang H, Brown CW, Matzuk MM: Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily; *Endocrine reviews* 2002, 23: 787-823
55. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, ten Dijke P: Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins; *Eur J Biochem* 2000, 267: 6954-6967
56. Dhanya SP, Hema CG: Small animal models of atherosclerosis; *Calicut Medical Journal* 2008, 6(4): e4
57. Drew AF: *Atherosclerosis. Experimental methods and protocols*, Humana Press 2001, s.1-16, ISBN 0-89603-751-7
58. Ignatowski AC: Influence of animal food on the organism of rabbits. *S Peterb Izviest Imp Voyenno-Med. Akad* 1908; 16: 154-173
59. Jawien J, Nastalek P, Korbut R: Mouse models of experimental atherosclerosis; *Journal of physiology and pharmacology* 2004, 55, 3, 503-517
60. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM and Kooistra T: Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers; *Arterioscler Thromb Vascular Biol* 2007; 27: 1706-1721
61. Paigen B, Morrow C, Brandon C et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 1985; 57: 65-73
62. Paigen B, Morrow A, Holme PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987; 68: 231-240
63. Bonthuis S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM: Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium – dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2333-2340
64. Mareckova Z, Keller S, Horky K: Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes, *Vnitr Lek* 1999; 45: 46-50

65. Ota T, Fujii M, Sugizaki T et al. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 2002; 193: 299-318